F1330

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

1
ANUL VI
1963

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI
DE
BIOCHIMIE

MŰSZAKI KÖNYVTÁRI DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883 ORSZÁGOS

1

ANUL VI

1963

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUȘANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacție.*

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacția: BUCUREȘTI, Str. Popovici nr. 20
Tel. 18.43.55 — 17.79.63

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul VI, nr. 1 1963

SUMAR

Pag.

A. V. PALLADIN, Metabolismul proteic în sistemul nervos 7

E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI şi S. RĂDULESCU, Migrarea pironinei şi albastrului de metilen prin tulpini de balsamine şi tomate. Teoria adsorbtivă a migrării substanţelor în plante 23

D. GH. POPOVICI şi V. V. MICUŞAN, Cercetări asupra fracţiunilor proteice din sîngele matern, din sîngele noului născut şi din colostru la capre 39

VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ, Analiza electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor citoplasmatice în procesul dezvoltării frunzei de bob (*Vicia faba*) 49

H. D. SCHELL, Acţiunea antiacetilcolinică şi anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben 61

S. VASU, Enzime pectolitice din *Aspergillus niger*. I. Producerea poligalacturonazelor în medii de cultură sintetice 71

D. MOŢET-GRIGORAŞ şi C. DRAGOMIRESCU, Elaborarea de anticorpi în starea de inhibiţie şi excitaţie medicamentoasă 87

V. EŞANU, Energia de activare a reacţiei de descompunere a H_2O_2 de către catalază la soiurile de cartofi sensibile şi la cele rezistente la atacul ciupercii *Phytophthora infestans* 91

GR. TURCU, P. TEITEL şi V. BRATU, Leziune biochimică eritrocitară pusă în evidenţă cu ajutorul fosforului radioactiv 97

NOTE DE LABORATOR

I. NIŢULESCU şi L. ENESCU, Determinarea fosfatazei alcaline prin metoda electrometrică 109

M. ŞERBAN, D. TĂNĂSESCU şi S. VASU, Contribuţii la aplicarea micrometodei Lowry în condiţiile evaluării fracţiunilor proteice eluate prin gradient de concentraţie de clorură de potasiu 115

RECENZII 125

CONGRESE ŞI SIMPOZIOANE 149

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome VI, n° 1 1963

SOMMAIRE

Pag.

A. V. PALLADIN, Le métabolisme protéique dans le système nerveux 7

E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI et S. RĂDULESCU, La migration de la pyronine et du bleu de méthylène dans les tiges de balsamines et de tomates. Théorie adsorptive de la migration des substances dans les plantes 23

D. GH. POPOVICI et V. V. MICUŞAN, Recherches sur les fractions protéiques du sang maternel, du sang du nouveau-né et du colostrum chez les chèvres 39

VICTOR GHEŢIE et LUCIA BUZILĂ, Analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique des protéines cytoplasmatiques au cours du développement de la feuille de fève (*Vicia faba*) 49

H. D. SCHELL, Action antiacétylcholinique et anticholinestérasique de quelques sels quaternaires d'ammonium dérivés du stilbène 61

S. VASU, Enzymes pectolytiques de l'*Aspergillus niger*. I. Production des polygalacturonases dans des milieux synthétiques 71

D. MOŢET-GRIGORAŞ et C. DRAGOMIRESCU, Elaboration d'anticorps en état d'inhibition et d'excitation médicamenteuse 87

V. EŞANU, Energie d'activation de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase chez les variétés de pommes de terre sensibles et chez celles résistantes à l'attaque du champignon *Phytophthora infestans* 91

GR. TURCU, P. TEITEL et V. BRATU, Lésion érythrocytaire biochimique mise en évidence à l'aide du phosphore radioactif 97

NOTES DE LABORATOIRE

I. NIŢULESCU et L. ENESCU, Détermination de la phosphatase alcaline par la méthode électrométrique 109

M. ŞERBAN, D. TĂNĂSESCU et S. VASU, Contribution à l'application de la microméthode de Lowry dans les conditions de l'évaluation des fractions protéiques éluées par gradient de concentration de chlorure de potassium 115

COMPTES RENDUS 125

CONGRÈS ET SYMPOSIUMS 149

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том VI, № 1 1963

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

А. В. ПАЛЛАДИН, Обмен белков в нервной системе 7

Е. МАКОВСКИЙ, В. ФРУНЗЕТИ и С. РЭДУЛЕСКУ, Миграция пиронина и метиленовой сини через стебли бальзаминов и томатов. Абсорбционная теория миграции веществ в растениях 23

Д. Г. ПОПОВИЧ и В. В. МИКУШАН, Исследование белковых фракций крови матери, крови новорожденного и молозива козы 39

ВИКТОР ГЕЦИЕ и ЛУЧИЯ БУЗИЛЭ, Электрофоретический и иммуноэлектрофоретический анализ белков цитоплазмы в процессе развития листьев Vicia faba 49

Х. Д. ШЕЛЛ, Противоацетилхолиновое и противохолинэстеразное действие некоторых четвертичных солей аммония, производных стильбена 61

С. ВАСУ, Пектолитические энзимы из Aspergillus niger. I. Получение полигалактуроназ в синтетических питательных средах 71

Д. МОЦЕТ-ГРИГОРАШ и К. ДРАГОМИРЕСКУ, Выделение антител в состоянии лекарственного торможения и возбуждения 87

В. ЕШАНУ, Энергия активации реакции разложения перекиси водорода под влиянием каталазы у сортов картофеля, чувствительных и устойчивых по отношению к действию грибка Phytorphthora infestans 91

ГР. ТУРКУ, П. ТАЙТЕЛЬ и В. БРАТУ, Биохимическое эритроцитное поражение, выявленное при помощи радиоактивного фосфора 97

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

И. НИЦУЛЕСКУ и Л. ЕНЕСКУ, Определение щелочной фосфатазы электрометрическим методом 109

М. ШЕРБАН, Д. ТЭНЭСЕСКУ и С. ВАСУ, К вопросу о микрометоде определения белков по Лаури (изменённом). Применение этого метода для определения элюированных белковых фракций через градиент концентрации хлористого калия 115

РЕЦЕНЗИИ 125

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 149

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

METABOLISMUL PROTEIC ÎN SISTEMUL NERVOS*)

DE

ACADEMICIAN A . V. PALLADIN

Substanțele proteice din creier au fost mult timp considerate ca inerte din punct de vedere metabolic. Recunoscîndu-se că creierului îi este caracteristică o activitate metabolică înaltă, s-a considerat mult timp că această proprietate caracteristică este determinată, în fond, de metabolismul activ al glucidelor în el. Şi numai în ultimii cinci-zece ani s-a format convingerea că proteinele şi lipidele creierului sînt de asemenea metabolic active.

Proteinele şi lipoproteinele formează circa 90% din substanțele organice ale creierului, şi fără îndoială că trebuie să participe în mare măsură la metabolismul substanțelor din creier.

INCLUDEREA AMINOACIZILOR MARCAȚI ÎN PROTEINELE CEREBRALE

Primele cercetări asupra metabolismului proteinelor în creier, realizate pe calea studierii vitezei de includere a aminoacizilor marcați în proteinele creierului, au susținut oarecum părerea anterioară asupra inerției proteinelor cerebrale: în aceste cercetări, aminoacizii introduși intravenos sau intraperitoneal s-au inclus repede în proteinele ficatului, rinichilor şi majorității celorlalte organe, dar foarte lent în proteinele cerebrale [1], [2], [3], [4]. Din aceste cercetări s-a tras concluzia că proteinele cerebrale sînt inerte din punct de vedere metabolic şi asemănătoare proteinelor din țesutul conjunctiv — colagenului. Este adevărat că F. Friedberg [5] arătase că introducerea lentă a aminoacizilor în proteinele cerebrale, observată de mulți autori, este condiționată nu de inerția acestor proteine, ci de reținerea aminoacizilor de către bariera „sînge-creier", şi că includerea aminoacizilor marcați în creier are loc mai repede prin introducere intracisternală.

*) Traducerea a fost efectuată de Corina Iordache, cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

Metabolismul activ al proteinelor în creier a fost relevat de M. K. Gaitonde și D. Richter [6], [7], [8], care au determinat activitatea specifică atît a proteinelor cerebrale cît și a fracțiunii solubile în acid tricloracetic și au apreciat intensitatea includerii aminoacizilor marcați în proteine după activitatea specifică relativă, care reprezintă raportul dintre activitatea specifică a proteinelor și activitatea specifică a fracțiunii acidosolubile.

Activitatea metabolică crescută a proteinelor cerebrale a fost, după aceea, confirmată de cercetările în care bariera „sînge-creier" a fost ocolită prin injectarea aminoacizilor marcați chiar în lichidul cefalo-rahidian [9]. În acest caz, metionina marcată a pătruns repede în creier și s-a inclus repede în proteinele cerebrale.

G. E. Vladimirov [10], [11] a studiat includerea în proteinele cerebrale a glicinei și a tirozinei marcate cu carbon radioactiv. Determinînd activitatea specifică relativă a proteinelor cerebrale ale șobolanului, Vladimirov a găsit în experiențele cu glicină că în decurs de trei ore în proteine are loc reînnoirea a 1/30 părți glicină și a aminoacizilor care se formează din ea. În experiențele cu tirozina, care pătrunde repede în țesutul cerebral, Vladimirov a găsit că după 75 min radioactivitatea proteinelor și radioactivitatea filtratului deproteinizat pe 1 mg creier este aceeași și că timpul mediu de înjumătățire pentru proteinele cerebrale este de 112 ore sau 5 zile și jumătate.

O dovadă ulterioară a faptului că proteinele cerebrale nu sînt inerte, ci se găsesc într-o stare dinamică, se metabolizează activ, au dat-o lucrările lui H. Waelsch și colaboratori [12], [13], [14]. Ei au studiat includerea în proteinele cerebrale a lizinei marcate cu carbon radioactiv și au găsit că, prin introducerea intravenoasă a lizinei marcate, aceasta se include repede atît în proteinele hepatice cît și în cele cerebrale, chiar în experiențele de scurtă durată. Aceleași rezultate au dat experiențele cu leucină marcată.

Toate aceste date arătau că proteinele cerebrale se găsesc în stare de metabolism activ. Despre aceasta vorbeau de asemenea și experiențele de includere a fosforului marcat în fosfoproteine [15].

VITEZA DE REÎNNOIRE A PROTEINELOR CEREBRALE; VALORILE „SEMIVIEȚII"

După viteza de includere a aminoacizilor în proteinele cerebrale se apreciază viteza de reînnoire a acestora. Viteza de reînnoire a proteinelor se indică, de obicei, ca „timpul de înjumătățire" sau „semiviața" proteinelor. De obicei, valoarea semivieții se apreciază pornind de la determinarea vitezei de includere a unui aminoacid, considerînd că viteza includerii lui se poate lua drept măsură a reînnoirii întregii proteine [16].

Calculul vitezei de reînnoire a proteinelor cerebrale și a semivieții necesită cunoașterea activității specifice a amino-acidului inclus în cazanul metabolic („metabolic pool") al aminoacizilor [17], [18].

Cercetările au arătat că, în dependență de intervalele de timp care trec între introducerea aminoacizilor și sacrificarea animalului, se obțin diferite valori ale vitezei de includere a aminoacizilor și semivieții proteinelor; cu cît este mai mare acest interval de timp, cu atît este mai mică viteza de reînnoire și cu atît este mai mare valoarea semivieții.

M. K. Gaitonde și D. Richter [9], măsurînd viteza de includere a metioninei marcate și calculînd cu ajutorul ei semiviața proteinelor, au găsit-o ca fiind egală, în medie, cu 13,7 zile; această valoare, în experiențele lor, oarecum nu a depins de intervalul de timp dintre introducerea metioninei și sacrificarea animalului. Din contră, A. Lajtha [19], [20], [21] și H. Waelsch [22], [23] au găsit că semiviața proteinelor cerebrale, calculată de ei, a crescut o dată cu mărirea intervalului de timp dintre introducerea aminoacizilor și sacrificarea animalului. Ei au obținut aceste rezultate studiind viteza de includere a lizinei marcate și au găsit că, pentru un interval de timp de 2 min de la introducerea lizinei și pînă la sacrificarea animalului, valoarea semivieții este de 2,8 zile, iar pentru un interval de 60 min se obține o valoare a semivieții egală cu 15,2 zile.

Aceeași dependență a valorilor semivieții de intervalele de timp dintre introducerea aminoacizilor și sacrificarea animalului a fost găsită folosind leucina marcată cu carbon radioactiv.

Autorii explică dependența semivieții proteinelor de durata intervalului de timp dintre introducerea aminoacidului marcat și sacrificarea animalului prin viteza diferită a metabolismului diverselor proteine cerebrale. În experiențele cu intervale scurte de timp se măsoară semiviața proteinelor care se metabolizează repede, adică a proteinelor cu semiviață scurtă. Dimpotrivă, în experiențele cu intervale lungi de timp, cînd proteinele care se metabolizează repede pierd o mare parte din marcarea lor și pot fi pe deplin resintetizate, pe primul plan apar proteinele care se metabolizează mai încet, care au o semiviață mult mai lungă. După datele lui H. Waelsch [24], metabolismul proteinelor cerebrale care se metabolizează repede poate fi măsurat numai în experiențe de durată foarte scurtă.

Cercetarea proteinelor cerebrale a confirmat prezența în creier a unei serii întregi de proteine distincte care pot avea un metabolism diferit. Aceasta au demonstrat-o experiențele lui N. M. Poliakova [25], care a întrebuințat pentru separarea proteinelor solubile din creier metoda electroforezei pe agar-agar și a arătat că proteinele cerebrale sînt constituite dintr-un număr foarte mare de proteine distincte.

Faptul că diversele proteine cerebrale se metabolizează cu viteză diferită este arătat de cercetările lui E. M. Kravcinski și T. P. Silici [26], care au determinat viteza de includere a metioninei marcate în diferite fracțiuni ale proteinelor cerebrale.

Fracțiunile proteice au fost obținute prin extracție cu soluție de NaCl 0,14 M, soluție de NaCl 1M și soluție de NaOH 1N; cea de-a patra fracțiune a fost fracțiunea proteinelor insolubile în hidroxid de sodiu. Cercetările au arătat că metionina se include mult mai intens în fracțiunile proteice care se extrag cu soluții de clorură de sodiu; pentru fracțiunea alcalină și în special pentru reziduul alcalino-insolubil, este caracteristică o viteză mult mai mică de includere a radiometioninei.

Rezultate asemănătoare a obținut G. E. Vladimirov [11], studiind includerea tirozinei în cinci fracțiuni proteice ale creierului, solubile în apă, în soluție Edsall, în clorură de sodiu 10%, în soluție 0,1 N de hidroxid de sodiu și în reziduu, după extracția cu alcalii; cercetările au arătat că tirozina se include în proteinele tuturor celor cinci fracțiuni, dar mult mai

repede în fracțiunea proteinelor solubile în apă și mult mai încet în reziduul insolubil.

Prin urmare, cele mai active proteine din punct de vedere metabolic sînt cele extrase cu NaCl, iar cele mai puțin active sînt proteinele care rămîn în precipitat după extracția cu alcalii.

Întrucît cercetările expuse mai sus au stabilit că proteinele cerebrale sînt metabolic active, natural că se naște problema localizării proteinelor active în creier, unde anume are loc includerea aminoacizilor în creier și dacă în general noi putem spune că metabolismul proteic este localizat în vreuna din structurile creierului.

VITEZA DE REÎNNOIRE A PROTEINELOR DIN DIFERITELE PĂRȚI ALE CREIERULUI

Una dintre posibilitățile de rezolvare a acestei probleme este determinarea includerii aminoacizilor marcați în proteinele diferitelor părți ale creierului.

Studierea vitezei metabolismului proteinelor a arătat că proteinele din diferite părți ale sistemului nervos se metabolizează cu viteză diferită. Astfel, A. V. Palladin și N. Vertaimer [27], studiind viteza de includere a radiometioninei în diverse părți ale sistemului nervos, au găsit că radiometionina se include mult mai repede în proteinele substanței cenușii a emisferelor cerebrale și a cerebelului. Mult mai încet are loc includerea metioninei marcate în măduva spinării sau în substanța albă a emisferelor cerebrale; încă și mai încet are loc includerea metioninei în proteinele nervului sciatic.

A. B. Richter, M. Gaitonde și P. Cohn [28] au studiat includerea metioninei marcate în diferite părți ale creierului de șobolan, prin determinarea activității specifice a proteinelor acestor părți după 20 min și după 3 ore de la injecția intraperitoneală. Ei au găsit activitatea specifică cea mai crescută în proteinele scoarței cerebelului și cea mai scăzută în proteinele substanței albe (corpului calos); locuri intermediare au ocupat scoarța emisferelor, bulbul rahidian și mezencefalul — talamusul și hipotalamusul.

Viteza de reînnoire a proteinelor în diferitele părți ale creierului maimuțelor adulte a fost studiată de S. Furst, A. Lajtha și H. Waelsch [29]. După datele lor, proteinele emisferelor posedă un metabolism crescut în comparație cu proteinele dispuse mai profund, în părțile mult mai bătrîne ale creierului.

S. Furst, A. Lajtha și H. Waelsch au încercat să calculeze timpul semivieții proteinelor măduvei spinării, substanței albe a emisferelor, bulbului rahidian, hipotalamusului, cerebelului și scoarței emisferelor cerebrale, determinînd activitatea specifică a lizinei în proteinele părții respective și activitatea specifică a lizinei libere în „pool"-ul de aminoacizi. Ei au obținut o viteză mare de metabolizare pentru substanța albă în comparație cu proteinele scoarței, ceea ce devine de neînțeles și pune la îndoială utilitatea determinării timpului semivieții cu ajutorul metodicii

utilizate de ei pentru amestecul complex de proteine care există în țesutul cerebral.

Faptul că viteza de includere a aminoacizilor marcați în diferite părți ale sistemului nervos este diferită este arătat și de rezultatele cercetărilor amintite mai sus ale lui E. M. Kravcinski și T. P. Silici, care au studiat includerea radiometioninei în diferite fracțiuni ale proteinelor din substanța albă și cenușie a creierului. Ei au găsit că proteinele diferitelor fracțiuni ale substanței cenușii din creier au o activitate specifică relativ mare față de proteinele fracțiunilor corespunzătoare ale substanței albe.

G. E. Vladimirov [11], studiind includerea glicinei marcate, a găsit de asemenea că reînnoirea proteinelor are loc mult mai intens în cerebel și în scoarța emisferelor cerebrale și mai puțin intens în măduva spinării și în mezencefal.

Întrucît datele expuse mai sus nu arată nimic despre legătura dintre metabolismul proteic și microstructura țesutului cerebral, s-au făcut încercări de a studia includerea aminoacizilor în diferite părți ale creierului cu ajutorul metodei autoradiografice. Astfel de cercetări au fost făcute de P. Cohn, M. Gaitonde și D. Richter [30]. Autoradiogramele din secțiuni de creier, preparate după introducerea metioninei marcate, au dat o imagine caracteristică: scoarța cerebelului a fost deosebit de întunecată în comparație cu substanța albă, iar întunecarea a fost minimă în acele părți care conțineau materialul axonilor și mult mai intensă în părțile bogate în celule nervoase. În zonele cum sînt scoarța cerebelului și cornul lui Ammon, întunecarea părților a corespuns dispunerii straturilor de celule nervoase.

În general, repartiția macroscopică a părților întunecate pe autoradiograme a corespuns rezultatelor arătate mai sus, obținute prin determinarea radioactivității specifice a diferitelor părți ale creierului.

Aceste rezultate au fost confirmate de Z. Lodin și L. Koloušek [31].

P. Cohn, M. Gaitonde și D. Richter, în special, au arătat că radioactivitatea proteinelor pe secțiuni a fost determinată de aminoacidul marcat, prins prin legături peptidice și nu de aminoacidul liber, deci întunecarea autoradiogramelor a fost condiționată de aminoacizii marcați, incluși în proteinele tisulare.

Totuși, trebuie să avem în vedere că autoradiografia nu este o metodă de măsurare a vitezei metabolismului. Autoradiogramele arată numai faptul că proteinele se metabolizează în țesuturi și constată aproximativ în ce țesuturi se găsesc aminoacizii marcați.

Astfel, cercetările asupra includerii aminoacizilor în proteinele creierului intact, ca și în proteinele diferitelor părți ale sistemului nervos central, au confirmat neomogenitatea proteinelor cerebrale.

DEPENDENȚA METABOLIZĂRII PROTEINELOR CEREBRALE DE VÎRSTA ANIMALELOR

Se schimbă oare metabolizarea proteinelor în creierul animalelor de diferite vîrste în timpul dezvoltării ontogenetice?

D. M. Greenberg, F. Friedberg, M. D. Schulman și T. Winnick [32], în experiențe *in vitro*, au găsit o viteză crescută de includere a glicinei

marcate în proteinele creierului unui embrion de găină de 13 zile; la puii nou-născuți, viteza de includere este mai mică și, pe măsura creșterii lor, se micșorează treptat.

În experiențe pe șobolani, M. K. Gaitonde și D. Richter [7] au găsit că viteza de includere a metioninei în proteinele cerebrale, apreciind după valoarea activității lor specifice, este mult mai crescută la animalele tinere și scade treptat cu vîrsta. În aceste experiențe, aminoacidul s-a introdus intracisternal, prin urmare asupra vitezei de includere a metioninei nu au putut influența variațiile de vîrstă în bariera hemato-encefalică.

Viteza de includere a metioninei marcate în proteinele creierului iepurilor de diferite vîrste a fost studiată de A. V. Palladin, Ia. V. Belik și L. S. Kraciko [33]; ei au găsit cea mai mare intensitate de reînnoire a proteinelor cerebrale la iepurii nou-născuți; la iepurii în vîrstă de 11—12 zile (perioada de apariție a vederii) viteza metabolismului proteic este mai scăzută; la vîrsta de o lună ea este și mai scăzută, iar intensitatea cea mai redusă a metabolismului proteinelor în creier este caracteristică pentru animalele adulte.

Prin cercetări făcute la 2,5 ore după introducerea metioninei s-a putut observa o oarecare creștere a reînnoirii proteinelor în perioada de apariție a vederii la iepuri, adică în perioada de apariție a unei funcțiuni noi (de vedere).

Un nivel mult mai ridicat al metabolismului proteic în creier la șoarecii tineri a fost confirmat de A. Lajtha și H. Waelsch [34] în experiențe cu introducerea lizinei; ei consideră că creierul șoarecelui adult se deosebește de creierul imatur prin faptul că el conține proteine care se metabolizează mult mai încet. La animalul nou-născut, creșterea creierului este legată, pe cît se pare, de prezența proteinelor cu un metabolism mult mai crescut decît în orice fracțiune a proteinelor cerebrale ale animalelor adulte.

Experiențele cu leucină au arătat, de asemenea, că la șoarecii nou-născuți proteinele se metabolizează în creier mai repede decît la adulți. Proteinele cerebrale ale animalelor tinere și adulte se deosebesc prin compoziția lor în aminoacizi, ceea ce arată posibilitatea apariției unor noi proteine sau a măririi cantității de proteine specifice țesutului nervos la animalele adulte [35].

Părerea că la dezvoltarea creierului embrionilor metabolismul mult mai crescut al proteinelor depinde de prezența unor proteine care se metabolizează repede și că, pe măsura dezvoltării, metabolismul se schimbă în legătură cu apariția altor proteine, își găsește confirmarea în cercetările efectuate de N. M. Poliakova [36], care arată că pe măsura dezvoltării embrionare se complică situația atît în creier cît și în nerv, prin diferențierea compoziției lor în proteine solubile. Datele lui N. M. Poliakova au fost nu de mult confirmate de Iu. Mendețki [37].

Influența vîrstei asupra includerii aminoacizilor în proteinele cerebrale a fost studiată autoradiografic de P. Cohn, M. Gaitonde și D. Richter [30]. Autoradiogramele au arătat că la șobolanul de o zi aminoacizii incluși (metionina) se răspîndesc difuz în toate zonele; dar, chiar și la această vîrstă, întunecarea a fost mult mai considerabilă în părțile corticale decît în corpul calos și în alte structuri. În creierul șobolanului adult

imaginea s-a schimbat; în cerebel, de pildă, pe cînd la şobolanul tînăr includerea a fost maximă în stratul molecular, la şobolanul adult includerea se deplasează în stratul granular.

VITEZA DE REÎNNOIRE A PROTEINELOR DIFERITELOR STRUCTURI SUBCELULARE CEREBRALE

În experienţele lui H. Waelsch, A. Lajtha şi colaboratori [19], [20], scoarţa cerebrală a maimuţei, căreia i s-a introdus aminoacidul marcat, a fost supusă centrifugării diferenţiale după omogenizare în soluţie izotonică de zaharoză, extrăgîndu-se astfel nucleii, mitocondriile şi microzomii. Cea mai mare includere şi cea mai mare viteză de reînnoire s-au găsit la fracţiunea microzomică. Ribozomii extraşi prin centrifugarea ulterioară a microzomilor au manifestat o şi mai mare viteză de includere.

Includerea metioninei marcate în proteinele nucleare şi citoplasmatice ale ţesutului cerebral a fost studiată de Ia. V. Belik şi L. S. Kraciko [38]; în experienţele lor metionina s-a introdus subcutan, apoi s-a determinat radioactivitatea specifică a proteinelor fracţiunii nucleare şi citoplasmatice a creierului şi cerebelului. Cercetările au arătat că proteinele nucleare şi citoplasmatice ale ţesutului cerebral se caracterizează printr-o viteză diferită de includere a metioninei marcate: în proteinele nucleului, metionina se include mai intens decît în proteinele citoplasmei.

Aceste deosebiri în reînnoirea proteinelor nucleare şi citoplasmatice ale emisferelor cerebrale stau în legătură, evident, cu compoziţia proteică diferită a acestor formaţiuni, cu viteza diferită de reînnoire a proteinelor care intră în compoziţia lor, adică cu particularităţile funcţionale ale acestor părţi şi structuri.

A. V. Palladin, Ia. V. Belik şi L. S. Kraciko [39] au introdus metionina în proteinele diferitelor elemente structurale celulare ale emisferelor cerebrale şi ale cerebelului de pisică şi le-au extras prin centrifugarea diferenţială a omogenatelor ţesutului cerebral. Determinînd radioactivitatea specifică a proteinelor diferitelor fracţiuni celulare, s-a găsit că în emisfere, ca şi în cerebel, cel mai intens se metabolizează proteinele fracţiunii microzomice; prin intensitatea cea mai scăzută a metabolismului se caracterizează proteinele fracţiunii mitocondriale; proteinele fracţiunii nucleare ocupă o poziţie intermediară. Reînnoirea proteinelor structurilor celulare separate din ţesutul de cerebel este mai intensă decît reînnoirea proteinelor corespunzătoare fracţiunilor intracelulare ale emisferelor cerebrale.

Includerea aminoacizilor marcaţi în fracţiunile celulare ale ţesutului cerebral, extrase prin metoda centrifugării diferenţiale după introducerea radiometioninei, a fost studiată de D. H. Clouet şi D. Richter [40], [41]. Ei au găsit de asemenea că cea mai mare viteză de includere o prezintă proteinele din fracţiunea microzomică.

Fracţionîndu-se ulterior proteinele din microzomi, s-a observat că cea mai mare activitate de includere o prezintă fracţiunea proteinelor care conţine lipide şi acizi nucleici şi poate fi extrasă din microzomi prin extrageri succesive cu ajutorul unei soluţii molare de clorură de sodiu şi al unei

soluții normale de hidroxid de sodiu. Această fracțiune proteică liponucleinică s-a colorat cu reactivul Niessl, și, după proprietăți, a corespuns agregatelor nucleoproteice ale corpului lui Niessl din celulele nervoase.

Cercetările făcute după cinci ore de la injectarea metioninei marcate au constatat o micșorare treptată a radioactivității specifice a nucleoproteinei microzomale concomitent cu o creștere a radioactivității specifice a celorlalte fracțiuni. D. H. Clouet și D. Richter au găsit că scăderea activității specifice a proteinelor microzomale și creșterea activității specifice a proteinelor din nucleu, din mitocondrii și din fracțiunea solubilă, o dată cu scăderea concomitentă a activității specifice a fracțiunii neproteice, devin și mai clare dacă rezultatele sînt exprimate sub forma activității specifice relative, care reprezintă raportul dintre activitatea specifică a fracțiunii proteice față de activitatea specifică a fracțiunii neproteice.

Prin calcul s-a stabilit că semiviața proteinelor din toate subfracțiunile microzomale este foarte scurtă, de la 58 la 128 min. Lipoproteina purificată a manifestat o activitate metabolică ridicată și a avut o semiviață egală cu 50—90 min.

H. Waelsch [23] presupune de asemeni că fracțiunea microzomică conține proteine care pot să se metabolizeze în timp de o oră.

Pe baza acestor date, D. H. Clouet și D. Richter au exprimat presupunerea că nucleoproteinele microzomilor, care reprezintă probabil partea componentă principală a granulelor lui Niessl, sînt transmițătorii aminoacizilor pe alte proteine. La început, evident, are loc includerea aminoacizilor marcați în proteinele microzomilor, iar după aceea aminoacidul marcat este transmis proteinei altor fracțiuni intracelulare.

S. Furst, A. Lajtha și H. Waelsch [29] au cercetat includerea lizinei marcate în fracțiunile intracelulare obținute din regiuni funcțional diferite ale creierului; după viteza de includere a lizinei marcate, s-a dovedit că în toate regiunile fracțiunile microzomice au fost cele mai active.

METABOLISMUL PROTEIC ÎN NERV

Atît din punct de vedere al metabolismului substanțelor proteice, cît și prin structura lor proteică, nervii periferici se deosebesc de creier. Înainte de toate trebuie să arătăm că, în conformitate cu rezultatele studiului făcut de N. M. Poliakova [42] cu ajutorul electroforezei pe hîrtie a proteinelor diferitelor secțiuni ale sistemului nervos central și a proteinelor nervilor periferici, proteinele creierului se deosebesc foarte mult de acelea ale nervului periferic. În nerv există o mare cantitate de albumină, ca și o altă cantitate a fracțiunii globulinice; fracțiunea globulinică din creier nu este la fel cu cea din nerv, fapt adeverit de salifierea lor diferită cu sulfat de amoniu.

Cercetările lui T. P. Silici [43] au arătat că introducerea radiometioninei în proteinele nervului are loc mult mai încet decît în proteinele creierului, atît în substanța albă cît și în cea cenușie; activitatea specifică relativă a proteinelor nervului sciatic este cu mult mai redusă decît activitatea specifică a substanței albe și cenușii a emisferelor cerebrale. Prin

studierea introducerii radiometioninei în diferite fracțiuni ale proteinelor nervului (extractibile cu clorură de sodiu și hidroxid de sodiu), s-a constatat că proteinele diferitelor fracțiuni se deosebesc unele de altele după intensitatea metabolismului lor: în unele din ele metionina se include încet, în altele destul de intens. Cele mai active sînt fracțiunile proteice care se extrag cu soluție de clorură de sodiu, cele mai puțin active sînt proteinele precipitatului proteic insolubil.

Comparîndu-se intensitatea metabolismului diferitelor fracțiuni ale proteinelor nervului cu aceea a fracțiunilor proteice corespunzătoare ale creierului, s-a constatat că metabolismul tuturor fracțiunilor proteice ale nervului este mai puțin intens decît metabolismul fracțiunilor corespunzătoare ale creierului.

Prin urmare, diferitele funcțiuni ale nervilor periferici și ale sistemului nervos central depind de compoziția lor proteică diferită și de intensitatea diferită a metabolismului substanțelor proteice; în sistemul nervos central predomină proteinele cu un metabolism mai ridicat și cu o semiviață mai scurtă iar în nervii periferici proteinele cu un metabolism mult mai scăzut și cu o semiviață mult mai îndelungată.

METABOLISMUL PROTEINELOR ÎN CREIER ÎN STAREA DE EXCITAȚIE

Este extrem de important să se clarifice legătura dintre metabolismul proteinelor în creier și creșterea sau scăderea activității funcționale a acestuia.

O serie de cercetători au descris variațiile activității specifice a proteinelor creierului sub influența diferitelor substanțe medicamentoase, folosind în cercetările lor introducerea intravenoasă sau intraperitoneală a unor aminoacizi marcați. Așa, de exemplu, P. D. Maclean [44] a comunicat influența rezerpinei asupra includerii metioninei în proteinele creierului. Interpretarea rezultatelor experiențelor de acest fel, cu tot interesul pe care ele îl prezintă, apare adeseori foarte dificilă. În aceste condiții pot avea loc variații în viteza aportului sangvin la creier sau în permeabilitatea barierei „sînge-creier"; unele substanțe medicamentoase pot avea o influență asupra producerii de hormoni, care la rîndul ei influențează circulația sîngelui ș.a.m.d.

Alți autori, studiind influența stării de excitație asupra metabolismului proteinelor, au folosit acțiuni puternice asupra sistemului nervos, ca excitația epuizantă sau excitații care provoacă convulsii; variațiile observate de ei ar putea fi rezultatul unei influențe nespecifice asupra metabolismului tisular, fără legătură directă cu excitația naturală.

Multe cercetări s-au făcut cu metode care nu au permis să se evalueze cantitativ variațiile observate în metabolismul substanțelor sau să se tragă concluzii asupra variațiilor vitezei de reacție; aceasta se întîmplă la evaluarea radioautografică a vitezei de includere a aminoacizilor în proteinele creierului, fără a cunoaște valoarea „pool"-ului de aminoacizi și a activității specifice a aminoacidului. Totuși, dintr-o serie de cercetări efectuate pînă în momentul de față, se pot trage unele concluzii despre influența stării de excitație asupra metabolismului substanțelor proteice în creier.

Legătura dintre starea funcțională a creierului și metabolismul proteinelor a fost arătată încă din 1926 de către G. Gorodisskaia [45] care

a studiat influența excitațiilor fiziologice naturale asupra procesului de proteoliză în zona vizuală a scoarței emisferelor cerebrale la pisică și a stabilit că trecerea centrilor vizuali din starea de repaos relativ în stare de activitate crescută este legată de intensificarea proceselor de scindare a proteinelor.

Legătura dintre procesele de excitație și metabolismul proteinelor în sistemul nervos este arătată și în cercetările lui H. Hyden [46], [47], [48], [49], [50], care a folosit spectrofotometria în ultraviolet și metode microchimice. H. Hyden a găsit că, după o activitate motorie crescută ce urmează unei excitații electrice sau auditive, în celulele ganglionare respective se observă o creștere a conținutului de proteine dacă excitația a fost slabă, dar o scădere după o excitație epuizantă. Sintetizînd rezultatele cercetărilor sale ample, H. Hyden [51] trage concluzia că la o excitare funcțională metabolismul proteinelor se intensifică, cu predominanța fazelor anabolice în cazul unei excitații slabe și a fazelor catabolice în cazul unei excitații puternice, care duce la obosire și epuizare.

Variații asemănătoare în metabolismul proteinelor au fost semnalate de L. C. Abood [52], în experiențele sale cu creier de pisică perfuzat, și de A. Geiger [53], prin excitarea plexului brachial la pisică. Dovezi indirecte despre legătura dintre metabolismul proteinelor și starea de excitație aduc observațiile lui S. O. Brattgard [54] asupra variației conținutului de proteine în excitația celulelor ganglionare ale retinei.

Pentru lămurirea variațiilor metabolismului proteinelor cerebrale în legătură cu starea de excitație a fost fructuoasă folosirea izotopilor radioactivi.

G. A. Neceaeva [55], în laboratorul lui Vladimirov, studiind viteza includerii sulfului marcat al metioninei în proteinele cerebrale la excitarea receptorilor dermici cu curent electric, a găsit că în starea de excitație a sistemului nervos central, care survine ca rezultat al unei astfel de excitări, intensitatea de reînnoire a proteinelor crește. La supraexcitare, legată de apariția simptomelor de inhibiție, intensitatea procesului de reînnoire scade. G. E. Vladimirov și A. P. Urinson [10], dimpotrivă, au găsit în aceste condiții o scădere a activității specifice relative a proteinelor creierului după introducere de glicină cu carbon marcat.

M. K. Gaitonde și D. Richter [8], folosind o excitare electrică producătoare de convulsii, au observat o micșorare neînsemnată a vitezei de includere a metioninei marcate în proteinele creierului; este posibil ca în experiențele lor să fi avut loc o supraexcitare care provoacă inhibiția.

Neconcordanța rezultatelor obținute de diferiții autori în studiul metabolismului proteinelor din creier cu ajutorul metodei atomilor marcați poate avea o serie de cauze. În astfel de experiențe au o mare importanță cunoașterea mărimii „pool"-ului de aminoacizi, determinarea activității specifice relative, calculul factorului timp, adică studiul vitezei de includere a aminoacizilor marcați, după diferite intervale de timp de la introducerea lor, calculul barierei „sînge-creier".

Studiind metabolismul proteinelor creierului în stare de excitație produsă prin introducerea fenaminei, A. V. Palladin, Ia. V. Belik și L. S. Kraciko [56] au studiat includerea radiometioninei la diferite intervale

după introducerea ei și au putut observa o intensificare a includerii metioninei în proteinele cerebrale numai în cazul cînd creierul a fost cercetat la 2—3 ore după introducerea metioninei marcate.

Intensificarea reînnoirii proteinelor în starea de excitație a fost găsită și de N. V. Zaharov și R. L. Orlianskaia [57], în experiențele lor cu radiometionină.

În convulsiunile repetate produse prin introducerea unor doze convulsivante succesive de corazol, viteza de reînnoire a proteinelor cerebrale scade, după datele lui V. Rosenhardt și M. Maslova [58].

În accesele epileptice repetate, intensitatea metabolismului proteic din creier se schimbă, după datele lui K. I. Pogodaev și colaboratori [59], în funcție de numărul și frecvența crizelor convulsive; o dată cu creșterea lor, intensitatea metabolismului proteinelor scade. L. Koloušek [60] a găsit, de asemenea, că în accesul epileptic de origine farmacologică includerea radiometioninei în țesutul nervos scade. W. Dingman, M. B. Sporn și R. K. Davies [61], [62], în cercetările lor cu prolină marcată și metionină, nu au găsit variații ale vitezei de includere a acestora în proteinele cerebrale în șocul convulsiv.

O serie de autori au găsit că metabolismul fosfoproteinelor din creier crește în starea de excitație (N. V. Zaharov și R. L. Orlianskaia [57], C. Tarda [63], P. J. Heald [64], [65]).

A. Geiger [66], în experiențele sale cu perfuzarea creierului in situ, adăugînd glucoză marcată cu carbon radioactiv în sîngele care servea perfuziei, a studiat includerea carbonului radioactiv în proteinele scoarței cerebrale în timpul travaliului și repaosului. Experiențele au arătat că în timpul convulsiei viteza de includere a crescut; după întreruperea ei, includerea carbonului radioactiv s-a oprit mai întîi, iar după aceea a crescut din nou. Aceste variații au putut fi observate nu numai prin cercetarea radioactivității proteinelor totale ale creierului, ci și prin determinarea radioactivității proteinelor diferitelor fracțiuni intracelulare.

În afară de aceste variații ale metabolismului proteic, prin excitarea directă și indirectă se pot observa variații și în configurația proteinelor creierului, în proprietățile lor fizico-chimice, în ordinea lor structurală, ca și distrugerea proteinelor. În timpul stării de excitație, după datele lui G. Ungar, D. V. Romano și colaboratori [67], [68], [69], crește cantitatea grupărilor SH proteice, ceea ce indică reorganizarea structurii proteinelor care iau parte la mecanismul stării de excitație; aceasta vine în concordanță cu presupunerea că grupările sulfhidrilice proteice au un rol important în activitatea nervoasă.

Prin urmare, în starea de excitație a sistemului nervos central, produsă prin acțiuni care se apropie de cele fiziologice, metabolismul proteinelor crește. Totuși, în cazul acțiunii unor excitanți prea puternici, care duc la convulsii, precum și în cazul cînd acțiunea lor este prelungită, poate interveni epuizarea sistemului nervos sau starea de supraexcitare sau, în fine, inhibiția, iar metabolismul proteinelor scade.

METABOLISMUL PROTEIC ÎN STAREA DE INHIBIȚIE A ACTIVITĂȚII NERVOASE

Pentru a studia influența stării de inhibiție asupra metabolismului proteic în creier, cercetătorii au folosit diferiți narcotici și au studiat influența narcozei cu ajutorul metodei atomilor marcați.

Astfel, M.K. Gaitonde și D. Richter [8] au găsit că în timpul narcozei cu pentobarbital sau cu eter includerea metioninei marcate în proteinele creierului scade. La același rezultat au ajuns G. E. Vladimirov și A. P. Urinson [10], care au găsit în narcoza cu amital includerea carbonului radioactiv al glicinei în proteinele creierului se micșorează. O oarecare scădere a vitezei de includere a radiometioninei în proteinele cerebrale a fost observată și de K. I. Pogodaev și A. Ia. Mehedova [70] în narcoza cu amital.

G. A. Neceaeva [55], în laboratorul lui Vladimirov, a observat de asemeni, la șobolan în somn narcotic, o scădere a vitezei de reînnoire a proteinelor cerebrale.

În somnul narcotic produs prin introducerea uretanului și veronalului, A. Fridman-Pogosova [71], întrebuințînd metionină marcată și glicină, nu a găsit variații în metabolismul proteinelor creierului iepurilor.

În somnul narcotic produs prin introducerea subcutană a unui amestec de medinal-uretan și prelungit 24 ore, A. V. Palladin, Ia. V. Belik și L. S. Kraciko [56] nu au putut observa nici ei o scădere a vitezei de includere a metioninei marcate în proteinele creierului.

M. Promîslov [72] a observat micșorarea conținutului în proteine al creierului iepurilor în somn farmacologic îndelungat.

Cauza rezultatelor diferite obținute în cercetările arătate mai sus poate fi faptul că la unii autori avem de-a face cu somnul narcotic, iar la alții cu o narcoză mai mult sau mai puțin adîncă.

O serie de date, de exemplu acelea ale lui A. A. Smirnov [73], arată că somnul natural, somnul narcotic și narcoza nu produc aceleași variații în procesele metabolice ale substanțelor proteice în creier.

Pentru a studia metabolismul proteinelor din creier în starea de activitate scăzută a sistemului nervos central , Ia. V. Belik și L. S. Kraciko [74] au folosit animale care hibernează (popîndăi) și au studiat viteza de includere a metioninei marcate (introdusă subcutan cu 18 ore înainte de sacrificarea animalului) în proteinele creierului popîndăilor în diferite stări funcționale, și anume : în stare de veghe, în timpul hibernării și în trezire artificială.

Cercetările au arătat că în hibernare, care poate fi privită ca un proces de inhibiție îndelungată și adîncă a sistemului nervos central, reînnoirea proteinelor creierului se găsește la limita inferioară. Prin trezirea artificială a animalelor, cînd activitatea creierului a crescut brusc, intensitatea de reînnoire a proteinelor a fost mai ridicată (în medie de 25 de ori) decît la popîndăii în hibernare și, de asemenea, mai ridicată decît la cei în stare de veghe.

Sintetizînd cercetările expuse mai sus, trebuie să spunem că în momentul de față, deși recunoaștem rolul important al proteinelor în funcția

creierului și existența unei legături determinate între activitatea funcțională a sistemului nervos și metabolismul proteic din el, nu știm totuși în ce fel anume proteinele sînt legate de vreuna din funcțiunile sistemului nervos și care proteine sînt specifice țesutului nervos.

În sistemul nervos, într-adevăr, nu există numai o singură proteină specifică țesutului nervos, ci cîteva proteine specifice pentru diferite secțiuni funcționale ale sistemului nervos. A descoperi aceste proteine, a studia metabolismul lor în țesutul cerebral și variațiile acestui metabolism în fiecare din stările funcționale, a lămuri rolul lor specific, sînt cîteva din sarcinile fundamentale ale biochimiei sistemului nervos.

În conformitate cu părerea lui H. Waelsch, proteinele creierului reprezintă unități fundamentale responsabile pentru „informare" — una din sarcinile specifice ale sistemului nervos.

Cea mai mare activitate a metabolismului proteic are loc în regiunile bogate în celule nervoase. Dintre structurile subcelulare, aminoacizii se includ cel mai activ în microzomi, în lipoproteinele granulelor lui Niessl. Aceste proteine cu metabolism intens și semiviață scurtă, atrag atenția în momentul de față; totuși, nu încape îndoială că în sistemul nervos pot juca un rol important și unele proteine cu mult mai stabile, cu o semiviață mai lungă, de exemplu proteinele-fermenți și alte proteine legate de alte laturi ale metabolismului.

Anomalia funcției sistemului nervos central, înnăscută sau dobîndită, depinde desigur, de dezechilibrarea metabolismului proteic în creier, redistribuirea proteinelor specifice, creșterea sau scăderea conținutului lor în anumiți aminoacizi, variații în proteine-fermenți ș.a.m.d.

Variația proteinelor creierului și a metabolismului lor este una din bazele materiale ale diferitelor stări patologice.

Institutul de biochimie al Academiei
de Științe din R.S.S. Ucraina

BIBLIOGRAFIE

1. H. TARVER, M. MORSE, J. Biol. Chem., **173**, 53 (1948).
2. F. FRIEDBERG, D. M. GREENBERG, J. Biol. Chem., **168**, 411 (1947).
3. D. M. GREENBERG, T. WINNICK, J. Biol. Chem., **173**, 199 (1948).
4. H. BORSOOK, J. Biol. Chem., **187**, 839 (1950).
5. F. FRIEDBERG, H. TARVER, D. GREENBERG, J. Biol. Chem., **173**, 355 (1948).
6. M. K. GAITONDE, D. RICHTER., Biochem J., **55**, VIII (1953).
7. M. K. GAITONDE, D. RICHTER, Biochem. J., **59**, 690 (1955).
8. M. K. GAITONDE, D. RICHTER, Proc. Roy. Soc., B., **145**, 83 (1956).
9. M. K. GAITONDE, D. RICHTER, *Metabolism. Nerv. Syst.*, Pergam. Press, 1957, p. 449.
10. Г. Е. ВЛАДИМИРОВ, А. П., УРИНСОН, Биохимия, **22**, 709 (1957).
11. Г. Е. ВЛАДИМИРОВ, *Актуальные вопросы соврем. биохимии*, I, Биохимия белков, Москва, 1959, 114.
12. H. WAELSCH, în *Metabolism of the Nervous System*, ed. by D. Richter, Pergamon Press,, 1957, 431.
13. H. WAELSCH, în *Biochemistry of the Central Nervous System*, ed. by F. Brucke. Pergamon Press, 1959, 36.
14. A. LAJTHA, J. Neurochem., 3, 358 (1959).

15. B. A. Энгельгардт, Н. П., Лисовская, Биохимия, **20**, 225 (1955).
16. M. Findlay, W. L. Magee, R. J. Rossiter, Biochem J., **58**, 236 (1954).
17. W. L. Magee., R. J. Rossiter, Biochem J., **58**, 243 (1954).
18. O. B. Henrigues, S. B. Henrigues, Neuberger A., Biochem. J., **60**, 409 (1955).
19. A. Lajtha, S. Furst A. Cerstein, H. Waelsch, J. Neurochem., **1**, 289 (1957).
20. A. Lajtha, S. Furst, in *Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissues*, ed. by H. Waelsch, New York : Hoeber-Harper, 1957, 195.
21. A. Lajtha, in *Regional Neurochemistry*, ed. by S. Kety and I. Elkes, Oxford, Pergamon Press, 1961, 25.
22. A. Lajtha, S. Furst, H. Waelsch, Experientia, **13**, 163 (1957).
23. H. Waelsch, in *Metabolism of the Nervous System*, ed. by D. Richter, Oxford, Pergamon Press, 1957, p. 431.
24. H. Waelsch, A. Lajtha, in *The Neurochemistry of Nucleotides and Amino Acids*, ed. by R.O. Brady and D. B. Tower, New York : John Wiley, 1960, 205.
25. Н. М. Полякова, В. К. Лишко., Укр. біохім. журн., **34**, 10 (1962).
26. Е. М. Кравчинский, Т. П. Силич, Укр. біохім. журн., **29**, 25 (1957).
27. А. В. Палладин, Н. Вертаймер, Д.А.Н. СССР, **102**, 319 (1955).
28. D. Richter, M. Gaitonde, P. Cohn, in D. Tower, P. Schade, *Structure and Function of Cerebral Cortex*, Amsterdam, 1960, 340.
29. S. Furst, A. Lajtha, H. Waelsch, J. Neurochem., **2**, 216 (1958).
30. P. Cohn, M. Gaitonde, D. Richter, J. Physiol., **126**, 7P (1954).
31. Z. Lodin, L. Koloušek, Physiol. Bohemosloven., **5**, 43 (1956).
32. D. M. Greenberg, F. Friedberg, M. D. Schulman, T. Winnick, Cold Spr. Harb. Symp., **13**, 113 (1948).
33. А. В. Палладин, Я. В. Белик, Л. С. Крачко, Биохимия, **22**, 359 (1957).
34. A. Lajtha, S. Furst, A. Gerstein, H. Waelsch, J. Neurochem., **1**, 289 (1957).
35. D. H. Clouet, M. K. Gaitonde, J. Neurochem, **1**, 126 (1956).
36. А. В., Палладин, Н. М. Полякова, Т. П. Силич, Физиол. журн. СССР, **43**, 611 (1957).
37. Ю. Мендецки, Автореферат канд. диссертации, Москва (1961).
38. Я. В. Белик, Л. С. Крачко, Укр. біохім. журн., **31**, 322 (1959).
39. А. В. Палладин, Я. В. Белик, Л. С. Крачко, Д.А.Н. СССР, **127**, 702 (1959).
40. D. H. Clouet, D. Richter, Biochem. J., **65**, 20P (1957).
41. D. H. Clouet, D. Richter, J. Neurochem., **3**, 219 (1959).
42. Н. М. Полякова, Д.А.Н. СССР, **109**, 1174 (1956).
43. Т. П. Силич, Укр. біохім. журн., **29**, 166 (1957).
44. P. D. Maclean, S. Flanigan, J. D. Flynn, C. Kim, J. R. Stevens, Yale J. Biol. Med., **28**, 380 (1956).
45. Г. Городисская, Наукові записки укр. біохім. інституту, **1**, 105 (1926).
46. H. Hyden, Acta Physiol. Scand. Suppl., **17**, 6 (1943).
47. H. Hyden, Cold. Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **12**, 104 (1947).
48. H. Hyden, in *Neurochemistry*, ed. by Elliott et al., Springfield, III : Thomas, 1955.
49. H. Hyden, in *Biochemistry of the Central Nervous System*, ed. by F. Brücke, Oxford : Pergamon Press, 1959, 64.
50. H. Hyden, S. Lovtrup, A. Pigon, J. Neurochem., **2**, 304 (1958).
51. H. Hyden, A. Pigon, J. Neurochem., **6**, 57 (1960).
52. L. C. Abood, A. Geiger, Am. J. Physiol., **182**, 557 (1955).
53. A. Geiger, S. Yamasaki, R. Lyons, Amer. J. Physiol., **184**, 239 (1956).
54. S. O. Brattgard, Acta Radiol. Suppl., **96**, 1 (1952).
55. Г. А. Нечаева, Биохимия, **22**, 546 (1956).
56. А. В. Палладин, Я. В. Белик, Л. С. Крачко, Биохимия, **22**, 359 (1957).
57. Н. В. Захаров, Р. Л. Орлянская, Вопр. мед. химии, **6**, 249 (1960).
58. В. Розенгарт, М. Маслова, Д.А.Н. СССР, **109**, 1176 (1956).
59. К. И. Погодаев, Н. Ф. Турова, Укр. біохім. журн., **31**, 849 (1959).
60. L. Koloušek, Physiol. Bohemosloven., **8**, 129 (1959).
61. W. Dingman, M. B. Sporn, J. Neurochem., **4**, 148 (1959).
62. W. Dingman, M. B. Sporn, R. K. Davies, J. Neurochem., **4**, 154 (1959).
63. C. Tarda, Amer. J. Physiol., **173**, 176, (1953).
64. P. J. Heald, Biochem. J., **66**, 659 (1957).
65. P. J. Heald, Biochem. J., **68**, 580 (1958).

66. A. GEIGER, J. MAGNES, R. S. GEIGER, Nature (Lond.), **170**, 754 (1952).
67. G. UNGAR, D. V. ROMANO, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **97**, 324 (1958).
68. G. UNGAR, E. ASCHHEIM, S. PSYCHOYOS, D. V. ROMANO, J. Gen. Physiol., **40**, 635 (1957).
69. G. UNGAR, D. V. ROMANO, Federation Proc., **18**, 162 (1959).
70. К. И. ПОГОДАЕВ, А. Я. МЕХЕДОВА, *Вопросы биохимии нервной системы*, Киев, 1957, 40.
71. А. ФРИДМАН-ПОГОСОВА, Д.А.Н. СССР, **102**, 1227 (1955).
72. М. ПРОМЫСЛОВ, Д.А.Н. СССР, **110**, 417 (1956).
73. А. А. СМИРНОВ, Д.А.Н. СССР, **101**, 913 (1955).
74. Я. В. БЕЛИК, Л. С. КРАЧКО, Укр. біохім. журн. **33**, 684 (1961).

MIGRAREA PIRONINEI ŞI ALBASTRULUI DE METILEN PRIN TULPINI DE BALSAMINE ŞI TOMATE

TEORIA ADSORBTIVĂ A MIGRĂRII SUBSTANŢELOR ÎN PLANTE

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI şi S. RĂDULESCU

Posibilitatea introducerii diferitelor sucuri şi soluţii în plante prin metoda capilară prezintă interes pentru rezolvarea diferitelor probleme de biochimie şi fiziologie vegetală, legate de agricultură, ca de exemplu: nutriţia extraradiculară, hibridarea vegetativă, rezistenţa la ger şi secetă, combaterea bolilor şi dăunătorilor etc. [1], [2]. Dar, utilizarea raţională a metodei capilare în practica cercetărilor experimentale necesită cunoaşterea aprofundată a modului cum se realizează în interiorul organismului vegetal migrarea soluţiilor şi substanţelor ce se introduc în plante prin această metodă. Or, după cum fenomenul migrării este considerat ca o simplă deplasare mecanică a sevei şi soluţiilor, prin fasciculele conducătoare ale plantei, sau ca rezultatul unui transport fiziologic complicat, s-au conturat pînă acum două teorii principale [3], [4]. Conform uneia, cunoscută sub numele de „teoria osmotică" susţinută de E. Münch [5], L. Bauer [6], K. Esau [7], M. Zimmerman [8] şi alţii, fasciculele conducătoare reprezintă un sistem pasiv de vase capilare în care seva şi soluţiile se deplasează ca atare datorită mai ales diferenţelor de presiune osmotică; se admite deci că toate componentele unei soluţii, adică apa şi substanţele dizolvate în ea, se deplasează prin fasciculele conducătoare împreună, adică cu aceeaşi viteză. Conform celeilalte teorii, „teoria metabolică", susţinută de A. L. Kursanov [9], A. L. Kursanov şi M. V. Turkina [10], [11], W. Schumacher şi M. Hülsbruch [12], J. Willenbrink [13], O. A. Pavlinova [14] şi alţii, fasciculele conducătoare reprezintă un sistem de vase fiziologic activ, în care transportul sevei şi al soluţiilor depinde mai ales de metabolismul ţesuturilor acestor fascicule; spre deosebire de teoria osmotică, se admite că prin vasele conducătoare soluţiile nu se deplasează ca atare, ci fiecare componentă a soluţiei, inclusiv apa, este transportată prin protoplasma vie a celulelor, independent una de alta şi cu viteze dife-

rite. Astfel de fenomene au fost constatate, de exemplu, de S. Chen [15], L. P. Vernon şi S. Aronoff [16], C. A. Swanson şi J. B. Whitney [17], O. Biddulph, S. F. Biddulph şi R. Cory [18], C. Nelson şi P. Gorham [19] şi alţii.

Rămîne de stabilit conform căreia dintre cele două teorii migrează prin fasciculele conducătoare din tulpini soluţiile şi substanţele introduse în plante în condiţiile metodei capilare. Dacă se va dovedi că componentele unei soluţii, adică apa şi toate substanţele dizolvate în ea, migrează prin fascicule împreună, deci cu aceeaşi viteză va însemna că avem de-a face cu deplasarea pasivă a soluţiilor, conform teoriei osmotice. Din contră, dacă se va constata că componentele soluţiilor migrează în interiorul plantelor independent una de alta şi cu viteze diferite, deşi în condiţiile metodei capilare ele pătrund simultan în plantă, va însemna că avem de-a face cu fenomene fiziologice de transport, conform teoriei metabolice.

În principiu, astfel de cercetări pot fi efectuate pe orice plante şi cu orice fel de substanţe solubile în apă şi netoxice pentru plantele respective. Totuşi, pentru început am preferat să recurgem la coloranţi, deoarece migrarea acestora prin fasciculele conducătoare ale plantelor cu tulpini mai mult sau mai puţin translucide poate fi urmărită şi măsurată direct, *in situ*.

Am lucrat în condiţii de laborator, la temperatura de 20—25°C, pe plante în ghivece şi anume pe balsamine (*Impatiens balsamina*) înalte de 18—22 cm, ale căror tulpini sînt translucide, şi pe tomate (*Solanum lycopersicum*, soiul *Bizon*) înalte de 20—25 cm, ale căror vase conducătoare, situate aproape de suprafaţa tulpinii, pot fi observate relativ comod. Am folosit doi coloranţi : pironina şi albastrul de metilen, în soluţii apoase diluate (0,5—1‰). Soluţiile coloranţilor pătrundeau în plante în condiţiile metodei capilare, printr-un fitil de bumbac format din 6 fire de aţă de cusut introdus în tulpină la 5—6 cm deasupra pămîntului ; tuburile în formă de U în care se introducea soluţia de colorant aveau diametrul intern 6 mm, înălţimea braţelor cîte 6 cm şi capacitatea 4 ml. Cum amănuntele metodei au fost descrise în lucrările anterioare [1], [20], redăm aici, în figura 1, numai schema montării unei experienţe. Pentru stabilirea vitezei de migrare se măsura din timp în timp, cu ajutorul unei rigle gradate în mm, porţiunea colorată a vaselor atît spre vîrf, cît şi spre rădăcină, începînd de la locul de introducere a soluţiei. S-a dovedit că aceste măsurători dau rezultate comparabile dacă sînt efectuate în aceleaşi condiţii şi pe aceleaşi plante.

Unele dintre rezultatele obţinute în martie 1962, prin măsurarea vitezei de migrare a colorafiei produse de pironina pătrunsă în vasele conducătoare din tulpinile de balsamine şi tomate sînt redate în figura 2, cele privind viteza de migrare a colorafiei, în cazul albastrului de metilen în figura 3, iar în figura 4 se arată comparativ migrarea colorafiilor pironinei în două balsamine şi a albastrului de metilen în altele două.

Se constată că :

— la plantele de acelaşi fel, colorafia datorită unuia şi aceluiaşi colorant migrează de-a lungul fasciculelor conducătoare aproximativ cu

aceeași viteză, variațiile de la o experiență la alta fiind datorite mai ales factorului individual al plantei;

— în tulpinile de balsamină, colorațiile migrează mai repede decît în cele de tomate;

— atît la balsamină, cît și la tomate colorația datorită pironinei migrează mai repede decît aceea a albastrului de metilen.

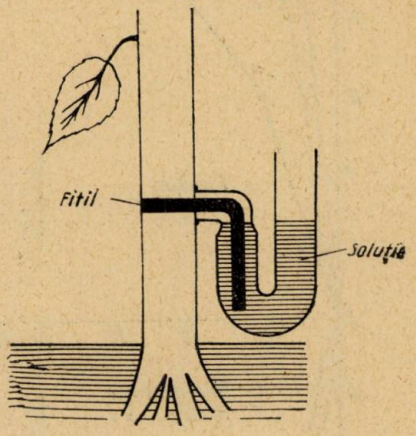


Fig. 1. — Schema unei experiențe cu metoda capilară.

Dacă ne situăm pe pozițiile *teoriei osmotice*, trebuie să admitem că în cazul nostru, cele două soluții de coloranți se deplasează prin fasciculele conducătoare ale plantelor ca atare, adică apa împreună cu colorantul dizolvat în ea; aceasta înseamnă că nivelul la care ajunge colorația în fascicule reprezintă locul pînă la care a ajuns soluția colorantului respectiv. Cum în plantele de același fel, dolorația pironinei migrează mai repede decît aceea a albastrului de metilen, rezultă că soluția diluată de pironină se deplasează prin fasciculele conducătoare cu o viteză mai mare decît soluția diluată a albastrului de metilen. Or, conform teoriei osmotice, era de prevăzut un alt rezultat. Într-adevăr, dacă se admite că prin vasele conducătoare soluțiile se deplasează ca atare, era de așteptat ca toate soluțiile diluate, care au aceeași vîscozitate și tensiune superficială să se deplaseze cu aceeași viteză în fasciculele plantelor de același fel și aceeași vîrstă, aflate în aceeași fază evolutivă și stare funcțională, precum și în aceleași condiții ale mediului ambiant. Prin urmare, ar trebui ca în cazul experiențelor descrise, soluțiile diluate de pironină și albastru de metilen să se deplaseze în plantele de același fel cu aceeași viteză. Ne-am putea aștepta la deosebiri în viteza lor de deplasare numai în cazul cînd soluțiile celor doi coloranți ar prezenta deosebiri de vîscozitate sau tensiune superficială. De aceea, am determinat la soluțiile apoase $1^0/_{00}$ de pironină și albastru de metilen, folosite pentru cercetare, atît vîscozitatea cu vîscozimetrul Ostwald, cît și tensiunea superficială cu stalagmometrul Traube. Datele obținute s-au dovedit însă atît de apropiate între ele, încît nu ar putea justifica deosebirile în vitezele de deplasare. Rezultă că în cazul introducerii în tulpini de balsamine și tomate a pironinei și albastrului de metilen prin metoda capilară, migrarea acestor soluții de-a lungul fasciculelor conducătoare se face cu viteze diferite și deci nu se încadrează în prevederile teoriei osmotice.

Să ne situăm acum pe pozițiile *teoriei metabolice*. Conform acestei teorii, energia furnizată de metabolism face ca componentele unei soluții, adică apa și substanțele dizolvate în ea, să fie transportate prin fasciculele conducătoare ale plantelor independent una de alta și cu viteze diferite.

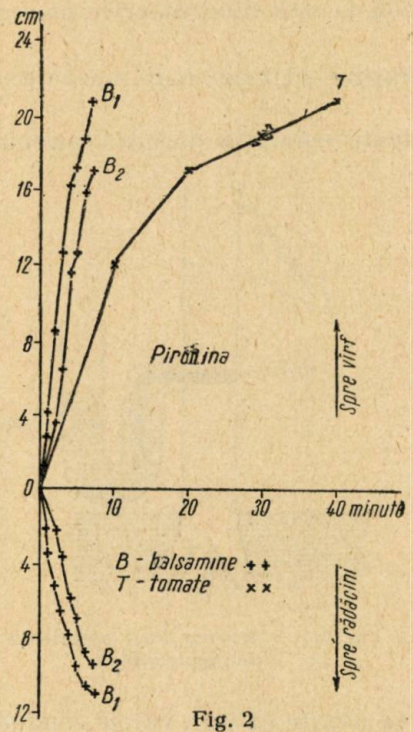


Fig. 2

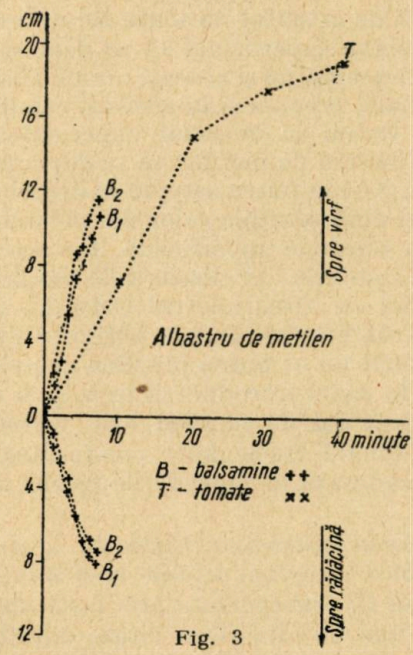


Fig. 3

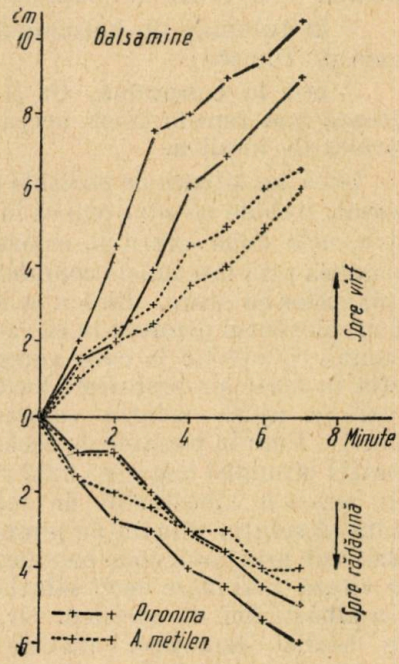


Fig. 4

Fig. 2. — Migrarea coloraţiei roşii prin fasciculele conducătoare din tulpini de balsamine şi tomate în cazul introducerii, prin metoda capilară, a soluţiei de pironină 0,5‰.

Fig. 3. — Migrarea coloraţiei albastre prin fasciculele conducătoare din tulpini de balsamine şi tomate în cazul introducerii, prin metoda capilară, a soluţiei de albastru de metilen 0,5‰.

Fig. 4. — Migrarea coloraţiei roşii şi albastre prin fasciculele conducătoare din tulpini de balsamine în cazul introducerii, prin metoda capilară, a soluţiei de pironină 0,5% în două plante şi a soluţiei de albastru de metilen 0,5‰ în altele două.

Aceasta înseamnă că în cazul nostru nivelul pînă la care ajunge colorația în fasciculele conducătoare reprezintă locul pînă la care a ajuns colorantul pătruns în plantă și nu soluția colorantului respectiv. Or, cum colorația pironinei migrează mai repede decît cea a albastrului de metilen, înseamnă că cei doi coloranți sînt transportați prin fascicule cu viteze diferite : primul mai repede decît celălalt. Este evident că, în aceste condiții, colorația fasciculului nu dă indicații cu privire la nivelul pînă unde a ajuns apa pătrunsă în plantă o dată cu colorantul.

Dat fiind că, conform teoriei metabolice, componentele unei soluții sînt transportate prin fasciculele conducătoare independent unele de altele și că în plantele de același fel pironina este transportată mai repede decît albastrul de metilen, era de așteptat ca și în cazul introducerii în plante a unei soluții care cuprinde de-o dată ambii coloranți, transportul acestora să se facă independent și cu viteze diferite. Astfel, ar urma să se producă de-a lungul fasciculelor conducătoare, separarea colorațiilor și, deci, apariția unor zone colorate diferit.

Pentru a verifica această supoziție, în august 1962 am introdus în plante de balsamine și tomate (soiurile *Bizon* și *Pheonia*) o soluție care conținea simultan atît pironină cît și albastru de metilen, fiecare în concentrație de 0,5‰. Conform așteptărilor, s-a constatat că, de-a lungul fasciculelor conducătoare, începînd cu locul de introducere a soluției în tulpini, se formează și înaintează atît spre vîrf cît și spre rădăcini două zone colorate prima în albastru și cealaltă în roșu, trecerea de la una la alta fiind marcată printr-o porțiune îngustă colorată în violet. Limitele dintre zone, fiind suficient de nete, permiteau măsurarea vitezei de migrare a colorațiilor ; astfel s-a dovedit că și în acest caz pironina este transportată de-a lungul fasciculelor conducătoare mai repede decît albastrul de metilen și independent de acesta (figura 5).

Se pare deci că transportul celor doi coloranți prin fasciculele conducătoare din tulpinile de balsamină și tomate se încadrează în prevederile teoriei metabolice. Totodată, e de menționat, că cele constatate nu pot fi explicate prin teoria osmotică, deoarece — conform acesteia — soluția care conține simultan cei doi coloranți ar fi trebuit să se deplaseze ca atare prin fasciculele conducătoare din tulpini, fără să se producă separarea coloranților și formarea zonelor diferit colorate.

Cu toate că rezultatele experimentale de mai sus concordă cu teoria metabolică, este greu de înțeles cum poate interveni metabolismul din tulpini în transportul celor doi coloranți care, datorită naturii lor chimice, nu se pot integra în metabolismul plantelor. De aceea, era necesar de verificat dacă transportul celor doi coloranți introduși în tulpini în condițiile metodei capilare, depinde într-adevăr de intensitatea metabolismului plantei.

În acest scop, am luat în considerație lucrările publicate de A. L. Kursanov [21], J. Willenbrink [13], H. Ziegler [22], M. V. Turkina [23] și alții, efectuate în vederea stabilirii relațiilor dintre transportul diferitelor substanțe prin țesuturile vegetale și metabolismul acestora măsurat indirect prin intensitatea procesului respirator. Acești autori au recurs la intoxicarea țesuturilor prin 2,4-dinitrofenol, arsenit de sodiu, fluorură de sodiu, acid monoiodacetic și alți inhibitori ai respirației, constatînd că

acolo unde transportul substanţelor depinde de metabolism, o dată cu intoxicarea ţesuturilor şi scăderea metabolismului lor transportul devine mai lent. Prin urmare, dacă în cercetările noastre metabolismul este acela care condiţionează transportul coloranţilor prin tulpini, ar trebui ca intoxicarea prealabilă a plantelor cu unul dintre agenţii inhibitori amintiţi să încetinească transportul pironinei şi albastrului de metilen de-a lungul fasciculelor conducătoare.

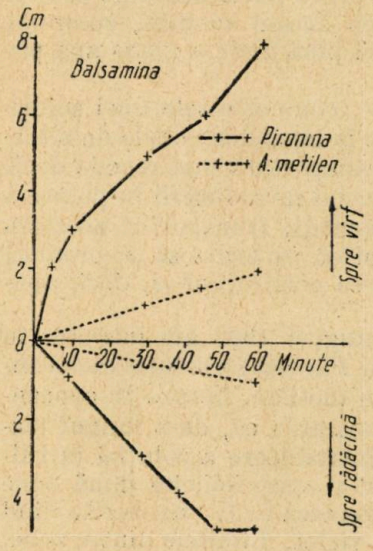


Fig. 5. — Migrarea colorației roșii și albastre prin fasciculele conducătoare din tulpina unei balsamine în cazul introducerii unei soluții ce cuprinde simultan pironină și albastru de metilen fiecare în concentrație de 0,5‰.

Dintre inhibitorii menţionaţi am ales arsenitul de sodiu, întrucît într-o lucrare anterioară [20], am obţinut cu această substanţă în concentraţie de 10^{-2} M, o inhibare puternică a consumului de oxigen la tulpinile de ardei (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum* — soiul *Seelandia*, *Zarea Komet*, nr. 10, *Bizon*) şi gura leului (*Anthirrhinum majus* —soiul *Dakota*). Trebuia deci în prealabil stabilit dacă acest inhibitor produce un efect similar şi la balsamine. Cum însă, în condiţiile metodei capilare, o dată cu arsenitul de sodiu pătrunde în plante şi o cantitate însemnată de apă, în care acesta e dizolvat, şi care la rîndul ei ar putea influenţa fenomenele de metabolism şi cele de transport din tulpini, era indicat ca experienţele de intoxicare a plantelor cu arsenit să fie însoţite de experienţe paralele, introducîndu-se în plante apa în locul soluţiei de arsenit. În fine, plantele trebuiau astfel alese încît să permită măsurarea în bune condiţii a intensităţii procesului respirator la tulpini, prin determinarea consumului de oxigen în aparatul Warburg.

Cercetările au fost efectuate în august 1962 pe balsamine de aceeaşi înălţime : 22—23 cm şi cu tulpini cam de aceeaşi grosime, 0,8—1 cm diametru. În plantele dintr-un lot introduceam, timp de 18 ore, o soluţie de 10^{-2} M arsenit de sodiu, iar în plantele din alt lot apă distilată. În acest interval de timp pătrundeau în plante 0,5—2 ml soluţie de inhibitor, respectiv apă, constatîndu-se spre sfîrşit la frunzele plantelor tratate cu arsenit de sodiu o oarecare tendinţă de epinastie. Apoi se tăia tulpina la 1,0 cm deasupra locului de introducere a fitilului, se îndepărtau frunzele şi se secţiona tulpina transversal, în bucăţi de cîte 3,0 cm lungime. Imediat după secţionare bucăţile de tulpini se cîntăreau, se măsura repede volumul lor, prin cufundare în apa dintr-un cilindru gradat, se uscau cu hîrtie de filtru şi se introduceau în vasele aparatului Warburg. În diverticulul lateral al acestor vase se puneau 0,5 ml apă, pentru menţinerea umidităţii aerului,

iar în micul diverticul central se introducea o fîșie de hîrtie de filtru de 4 cm lungime și 0,8 cm lățime, răsucită în spirală, care se îmbiba apoi cu 0,3 ml soluție de hidroxid de potasiu 20%. Urmărirea consumului de oxigen se făcea la 25°C, timp de o oră. Rezultatele obținute arată că, în aceste condiții, tulpinile plantelor de balsamină tratate cu arsenit de sodiu practic nu mai consumă oxigen, pe cînd tulpinile plantelor tratate cu apă prezintă un consum de oxigen relativ intens, asemănător cu cel al plantelor netratate. Aceasta înseamnă că, în condițiile noastre de lucru, arsenitul de sodiu în concentrație de 10^{-2} M, pătruns în balsamine, provoacă o puternică scădere a consumului de oxigen și deci o inhibare a metabolismului din tulpini.

Odată stabilit că, în decurs de 18 ore, soluția de arsenit de sodiu 10^{-2} M pătrunsă în plantele de balsamină oprește practic consumul de oxigen la tulpini, fără a produce fenomene înaintate de intoxicație a plantelor, am trecut la cercetarea vitezei de transport a coloranților introduși tot prin metoda capilară, atît în plantele intoxicate în prealabil cu arsenit, cît și în cele tratate în prealabil cu apă.

Astfel, în balsaminele dintr-un lot se introducea prin metoda capilară soluție de arsenit de sodiu 10^{-2} M, iar în cele dintr-un alt lot — apă distilată. După 18 ore se măsurau cantitățile de soluție de arsenit de sodiu și de apă pătrunse în plante, apoi, cu ajutorul unei siringi prevăzute cu un ac lung, se scotea din tuburi soluția de arsenit, respectiv apa, și în locul lor se introducea soluția de coloranți care conținea pironină și albastru de metilen, fiecare în concentrație de 0,5‰. Înlocuirea soluției se făcea cu grijă, evitîndu-se orice deplasare a fitilului introdus în tulpini, pentru ca soluția de coloranți să pătrundă în plante exact în aceleași condiții și prin aceleași fascicule conducătoare prin care a pătruns în prealabil soluția de arsenit de sodiu, respectiv apa. Migrarea coloraților de-a lungul fasciculelor conducătoare din tulpini era urmărită timp de o oră, prin măsurători efectuate la fel ca în experiențele precedente.

S-a constatat că atît la plantele intoxicate în prealabil cu soluție de arsenit de sodiu, cît și la plantele martor în care a fost introdusă în prealabil numai apă, se formează de-a lungul fasciculelor conducătoare, atît spre vîrf cît și spre rădăcină, cele două zone succesive, colorate una în albastru și cealaltă în roșu, cu porțiunea intermediară îngustă de culoare violetă, exact ca la plantele care nu au fost supuse vreunui tratament prealabil. Ceva mai mult, măsurătorile au demonstrat că la ambele loturi de plante vitezele de migrare ale fiecăreia dintre cele două coloraţii sînt aproximativ aceleași (figura 6). Or, conform teoriei metabolice era de așteptat ca la plantele intoxicate cu arsenit de sodiu migrarea coloraţiilor să se facă mult mai încet decît la cele tratate în prealabil numai cu apă.

Pentru explicarea acestei neconcordanțe între prevederile teoretice și datele experimentale, s-ar putea recurge la unele ipoteze suplimentare. Astfel, s-ar putea admite că soluția de coloranți care se introduce în plante după întreruperea tratamentului cu arsenit de sodiu, îndepărtează din țesuturile intoxicate arsenitul de sodiu, ceea ce permite revenirea metabolismului la normal. Această ipoteză însă nu poate fi susținută, deoarece este greu de admis că o cantitate mică de soluție de coloranți, de ordinul 0,05—0,10 ml, ce pătrunde în condițiile metodei capilare în plante în decurs

de o singură oră, poate îndepărta din ţesuturile intoxicate arsenitul de sodiu pătruns în decursul celor 18 ore de tratament.

S-ar mai putea admite că coloranţii care pătrund în plantele intoxicate cu arsenit de sodiu anihilează acţiunea toxică a arsenitului de sodiu şi reactivează metabolismul aducînd la normal consumul de oxigen la tulpini. Pentru a verifica această supoziţie, am determinat, procedînd la fel ca în experienţele precedente, consumul de oxigen la tulpinile de balsamine după ce plantele au fost tratate cu arsenit de sodiu, respectiv cu apă, timp de 18 ore, şi apoi timp de o oră cu soluţia celor doi coloranţi. Determinările însă nu au confirmat prevederile. S-a constatat că, în aceste condiţii, consumul de oxigen la tulpinile balsaminelor intoxicate cu arsenit de sodiu nu revine la normal după tratare cu soluţia de pironină şi albastru de metilen (tabela 1), deşi migrarea colorafiilor de-a lungul fasciculelor conducătoare se face în acelaşi mod ca la plantele martor tratate cu apă şi apoi cu coloranţi şi la care consumul de oxigen este intens (figura 7). Înseamnă că cei doi coloranţi introduşi în plantele intoxicate în prealabil cu arsenit de sodiu, nu anihilează acţiunea toxică a acestuia şi nu reactivează metabolismul tulpinilor.

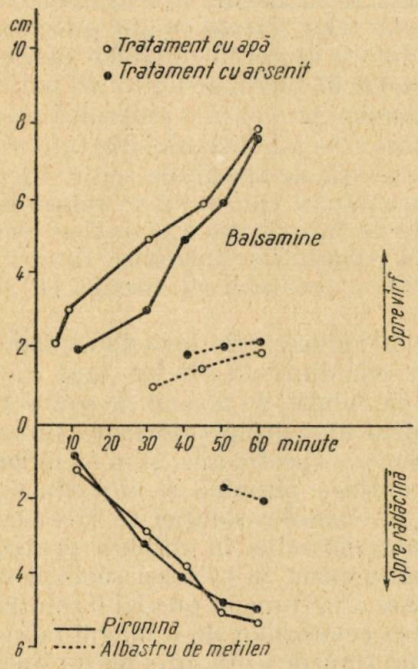


Fig. 6. — Migrarea coloraţiei roşii şi albastre prin fasciculele conducătoare din tulpina de balsamină martor (tratată cu apă) şi balsamina intoxicată cu arsenit de sodiu, în cazul introducerii prin metoda capilară, a unei soluţii ce cuprinde simultan pironina şi albastrul de metilen, fiecare în concentraţie de 0,5‰.

Cercetări similare, cu rezultate asemănătoare, au fost efectuate şi pe plante de tomate, soiul *Phoenia*.

Rezultă că migrarea pironinei şi albastrului de metilen de-a lungul fasciculelor conducătoare din tulpinile de balsamină şi tomate, se face independent de metabolismul tulpinii şi deci nu se datoreşte unui transport fiziologic activ determinat de metabolism. Prin urmare, fenomenele constatate de noi în cazul introducerii în balsamine şi tomate, prin metoda capilară a soluţiei ce conţine simultan pironină şi albastru de metilen nu se încadrează în prevederile teoriei metabolice.

Din moment ce fenomenele care se produc în cursul migrării pironinei şi albastrului de metilen de-a lungul fasciculelor conducătoare din tulpini nu pot fi interpretate prin teoria osmotică şi nici prin teoria metabolică, înseamnă că pentru interpretarea lor trebuie să recurgem la un alt punct de vedere, care ar putea constitui eventual, baza unei noi teorii cu privire la migrarea substanţelor în plante.

În acest scop era indicat să apelăm la acele fenomene, cunoscute și explicate din alte domenii ale științei, care prezintă asemănări cu cele pe care le-am constatat și vrem să le interpretăm. Or, fenomenele migrării cu viteze diferite ale coloranților și altor substanțe precum și fenomenul separării lor în cursul migrării se cunosc de mult în domeniul cromatografiei. Mai mult, luînd în considerație faptul constatat de O. Biddulph, S. Biddulph, R. A. Cory și H. W. Koontz [24], că apa marcată cu tritiu se deplasează în plante mai repede decît fosforul radioactiv, J. van Overbeck [25], s-a exprimat că „imaginea care apare nu este a unui flux nediferențiat, ci mai curînd a unei cromatograme în care solventul înaintează în fruntea substanțelor dizolvate" *). De aceea, s-ar putea pune problema dacă există vreo înrudire între migrarea coloranților în plante, cercetată de noi în condițiile metodei capilare, și migrarea acelorași coloranți prin materiale adsorbante în condițiile metodelor cromatografice. În cazul afirmativ, ar trebui ca pironina și albastrul de metilen să prezinte în cursul analizelor cromatografice comportări asemănătoare cu cele pe care le-am constatat la plante.

Pentru a verifica supoziția de mai sus, am efectuat cîteva încercări de separare a celor doi coloranți în condițiile cromatografiei ascendente pe hîrtie. Punînd pe hîrtie Whatman cîte o picătură din soluțiile diluate de pironină, de albastru de metilen și amestecul lor, și irigînd cu apa slab acidulată cu acid clorhidric (pH 6,0—6,5), am constatat că pironina migrează pe hîrtie mai repede decît albastrul

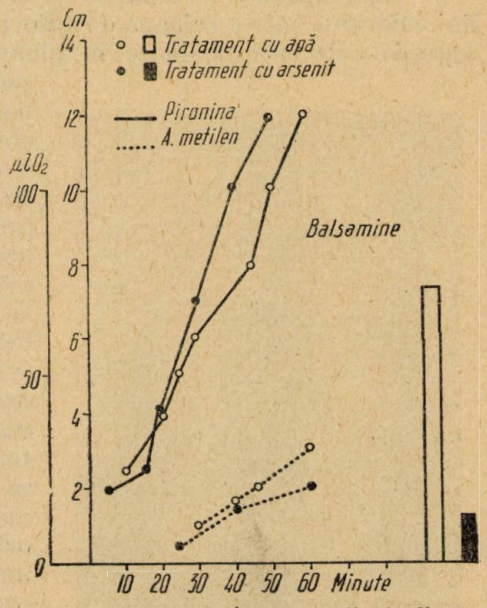


Fig. 7. — Migrarea coloranței roșii și albastre prin fasciculele conducătoare din tulpina de balsamină martor (tratată cu apă) și balsamină intoxicată cu arsenit de sodiu în cazul introducerii, prin metoda capilară, a unei soluții ce cuprinde simultan pironina și albastru de metilen, fiecare în concentrație de 0,5‰, precum și consumul de oxigen la tulpinile celor două plante.

Tabela 1

Consumul de oxigen ($\mu l\ O_2$) la tulpini de balsamină, după ce au fost tratate timp de 18 ore cu soluția de arsenit de sodiu (I) respectiv cu apă (II) și după ce timp de o oră a fost introdus amestecul de pironină și albastru de metilen. Citirile s-au făcut la 60 min după începerea determinărilor

Exp. nr.	I	II
1	0	25,5
2	4,5	68.8
3	0	49,5
4	7,5	100,0
5	1,5	40,0
6	9,6	58,5

*) „The picture emerging is not that of a mass flow rather of a chromatogram in which the solvent front moves ahead of the solutes".

de metilen și că amestecul lor se separă în componente, la fel ca în experiențele efectuate pe plante (figura 8).

Acest rezultat ne-a făcut să trecem la cercetarea comportării celor doi coloranți într-o coloană de adsorbție, în condiții fizico-chimice cît mai apropiate de cele existente în plante. În acest scop am realizat un dispozitiv care, într-o anumită măsură, poate fi considerat un model fizico-chimic al plantei și denumit „*plantă artificială*". Dispozitivul acesta (figura 9 A) este alcătuit dintr-un tub de sticlă (cu diametrul de 0,3—0,4 cm și 45 cm lungime) lărgit la un capăt sub formă de pîlnie (diametrul mare 3 cm) și prelungit la celălalt capăt prin intermediul unui tub scurt de cauciuc (1,5 cm) cu un alt tub de sticlă (6 cm lungime) de același diametru (0,3—0,4 cm). Acesta din urmă este astupat cu un dop de vată hidrofilă sau de hîrtie de filtru. Tubul de cauciuc se perforează transversal, cu ajutorul unei sîrme încinse, astfel ca cele două orificii să corespundă; dispozitivul se umple cu un material adsorbant, de exemplu cu hidroxid de aluminiu fin granulat și calcinat, iar prin cele două orificii ale tubului de cauciuc se introduce cu ajutorul unui ac, capătul unui fitil format din mai multe fire de ață de cusut, celălalt capăt fiind introdus într-un tub de sticlă îndoit în formă de U exact ca în cazul metodei capilare (figura 9 B). Întregul dispozitiv se fixează vertical cu ajutorul unui stativ, partea de jos fiind cufundată într-un vas cu apă. Prin capilaritate, apa pătrunde în materialul adsorbant și ajunge pînă în partea lărgită, de unde începe să se evapore. Astfel se realizează un curent lent ascendent de apă, prin acest dispozitiv a cărui parte de jos imită oarecum rădăcina, tubul de la mijloc — tulpina, iar partea lărgită — frunza.

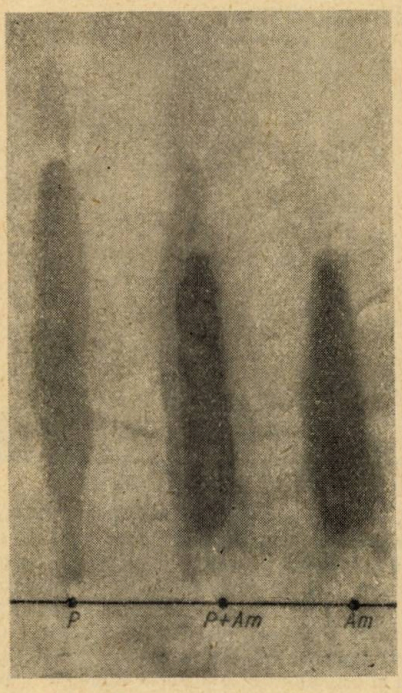


Fig. 8. — Migrarea pironinei (P), albastrului de metilen (Am), precum și a amestecului lor (P+Am) pe hîrtie Whatman în condițiile cromatografiei ascendente. Lichidul de irigare : apa slab acidulată (pH 6,0—6,5).

După ce materialul poros s-a îmbibat cu apă, se introduce în tubul U soluția de pironină și albastru de metilen, ambii coloranți fiind în concentrație de 0,5‰. Urcînd prin fitil, această soluție ajunge în „planta artificială" unde începe migrarea coloranților prin materialul adsorbant. Se constată că pironina se deplasează în ambele direcții mai repede decît albastrul de metilen, astfel încît pornind de la fitil se formează de-a lungul dispozitivului două zone colorate una în albastru și alta în roșu, avînd la

nivelul de separație o porțiune violetă, exact ca în cazul introducerii solu-

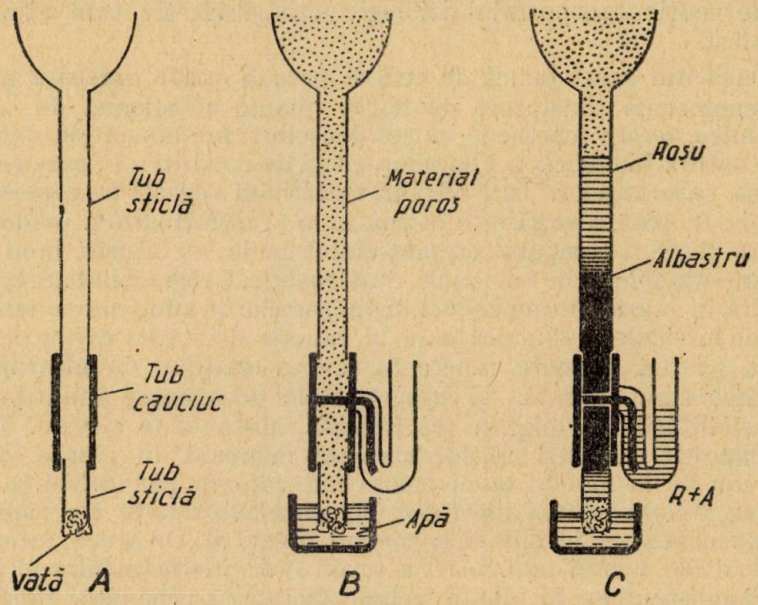


Fig. 9. — Schema experienței cu planta artificială :
A — planta artificială; B — planta artificială cu fitilul montat; C — migrarea coloranților în cazul introducerii, prin metoda capilară, a soluției ce cuprinde simultan pironină și albastru de metilen, fiecare în concentrație de 0,5‰.

ției celor doi coloranți în plante (figura 9C). Astfel migrarea coloranților în „planta artificială" (figura 10) și în plantele vii (figura 5) prezintă un paralelism remarcabil, care pare să indice că în ambele cazuri fenomenele de migrare se produc într-un mod analog.

Sîntem de părere că fenomenele constatate pot servi ca punct de plecare pentru elaborarea unei noi teorii cu privire la migrarea substanțelor în plante. Conform acestei teorii, care ar putea fi numită *teoria adsorbtivă*, în anumite împrejurări sistemul conducător al plantelor se comportă ca un fel de coloană de adsorbție de-a lungul căreia migrarea diferitelor soluții și substanțe se face după regulile și legile cunoscute în cromatografie. Astfel, separarea substanțelor introduse în plante prin metoda capilară, poate fi explicată prin intervenția acelorași factori care

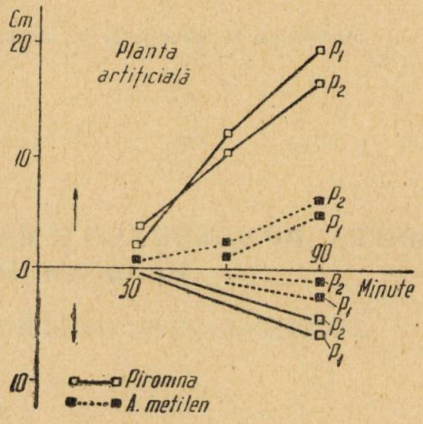


Fig. 10. — Migrarea coloranției roșii și albastre prin planta artificială, în cazul introducerii unei soluții ce cuprinde simultan pironină și albastru de metilen, fiecare în concentrație de 0,5‰.

acţionează în analiza cromatografică pe hîrtie şi pe coloană şi nu numai prin intervenţia transportului fiziologic activ şi selectiv, cum admite teoria metabolică.

Dacă din acest punct de vedere pare să existe oarecare paralelism între fenomenele constatate de noi la plante şi coloana de adsorbţie, totuşi între aceste fenomene există deosebiri fundamentale determinate atît de natura biologică a plantelor, cît şi de condiţiile în care se produce migrarea substanţelor. Într-adevăr, materialul vegetal pe care se produce adsorbţia în plante se găseşte în continuă transformare şi evoluţie şi de aceea nu poate fi comparat cu materialul neviu, cu însuşiri bine determinate care este folosit în coloanele de adsorbţie. Orice schimbare biochimică survenită în starea protoplasmei, membranelor şi altor componente adsorbante ale fasciculelor conducătoare în funcţie de starea evolutivă şi fiziologică a plantei se poate repercuta asupra relaţiilor de adsorbţie dintre substanţele care migrează şi componentele adsorbante amintite, modificînd posibilităţile de migrare ale fiecărei substanţe în plante. Totodată, e de remarcat că înseşi substanţele care migrează în plante, fie că se adsorb sau nu la nivelul fasciculelor conducătoare, pot influenţa la rîndul lor starea şi comportarea diferitelor elemente adsorbante ale plantei, ceea ce de asemenea poate influenţa mersul migrării. De aceea, interpretarea de pe poziţiile teoriei adsorbtive a rezultatelor investigaţiilor în problema migrării substanţelor în plante trebuie făcută cu prudenţă, precizîndu-se cît mai bine condiţiile în care se experimentează.

A admite teoria adsorbtivă cu privire la migrarea substanţelor în plante, nu înseamnă însă a combate celelalte teorii, osmotică şi metabolică, deoarece problema modului şi posibilităţilor de migrare a substanţelor în plante este prea complexă pentru a fi redusă, în ansamblul ei, la intervenţia unui singur factor : osmotic, metabolic sau adsorbtiv.

Prezentată la redacţie la 10 noiembrie 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., Bucureşti

МИГРАЦИЯ ПИРОНИНА И МЕТИЛЕНОВОЙСИНИ ЧЕРЕЗ СТЕБЛИ БАЛЬСАМИНОВ И ТОМАТОВ

АБСОРБЦИОННАЯ ТЕОРИЯ МИГРАЦИИ ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали миграцию пиронина и метиленовой сини через стебли бальзаминов и томатов, в условиях введения растворов красителей в растения капиллярным методом. Они установили, что

пиронин мигрирует скорее, чем метиленовая синь, и что на скорость миграции указанных двух красителей не влияет предварительное отравление растений арсенитом натрия. Ввиду того, что эти экспериментальные данные нельзя было объяснить с точки зрения существующих теорий, касающихся механизмов миграции веществ и растворов в растениях (осмотическая и метаболическая теории), авторы предложили новую теорию (абсорбционную); они основали свои теоретические предпосылки на экспериментальных работах, выполненных при помощи установки, которую, в известной мере, можно считать как бы физико-химической моделью растения и которую они назвали „искусственным растением". Согласно абсорбционной теории, при известных условиях, проводящая система стебля ведет себя подобно абсорбционной колонке, через которую миграция различных растворов и веществ осуществляется по правилам и законам, известным из хроматографии. Несмотря на то, что выявляется известный параллелизм между явлениями, констатированными у растений, и аналогичными явлениями на абсорбционной колонке, все же существуют и некоторые основные различия, зависящие как от биологической природы растений, так и от условий, в которых протекает миграция веществ.

Предлагая абсорбционную теорию относительно миграции веществ в растениях, автор отнюдь не отрицает других теорий — осмотическую и метаболическую — так как вопрос способа и возможности миграции веществ в растениях слишком сложен для того, чтобы его сводить к влиянию одного единственного фактора: осмотического, метаболического или абсорбционного.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Схема опыта, произведенного капеллярным методом.

Рис. 2. — Миграция красной окраски через проводящие пучки стеблей бальзаминов и томатов, при введении капиллярным методом раствора пиронина 0,5‰.

Рис. 3. — Миграция синей окраски через проводящие пучки стеблей бальзаминов и томатов при введении капиллярным методом раствора метиленовой сини 0,5‰.

Рис. 4. — Миграция красной и синей окрасок через проводящие пучки стеблей бальзаминов, при введении капиллярным методом раствора пиронина 0,5‰ в два растения и раствора метиленовой сини 0,5‰ в другие два растения.

Рис. 5. — Миграция красной и синей окрасок через проводящие пучки стебля бальзамина, при введении раствора, содержащего одновременно пиронин и метиленовую синь при концентрации каждого красителя 0,5‰.

Рис. 6. — Миграция красной и синей окрасок через проводящие пучки стебля контрольного бальзамина (обработанного водой) и бальзамина, отравленного арсенитом натрия, при введении капиллярным методом раствора, содержащего одновременно пиронин и метиленовую синь, при концентрации каждого красителя 0,5‰.

Рис. 7. — Миграция красной и синей окрасок через проводящие пучки стебля контрольного бальзамина (обработанного водой) и бальзамина, отравленного арсенитом натрия, при введении капиллярным методом раствора, содержащего одновременно пиронин и метиленовую синь, при концентрации каждого красителя 0,5‰, а также при потреблении кислорода стеблями этих двух растений.

Рис. 8. — Миграция пиронина (P), метиленовой сини (Am), а также их смеси (P + Am) на ваттманской бумаге № 1, в условиях восходящего хроматографирования. Промывная жидкость: слабо подкисленная вода (pH 6,0—6,5).

Рис. 9. — Схема опыта с искусственным растением : *A* — искусственное растение; *B* — искусственное растение с монтированным фитилем; *C* — миграция красителей при введении капиллярным методом раствора, содержащего одновременно пиронин и метиленовую синь, при концентрации каждого красителя 0,5‰.

Рис. 10. — Миграция красной и синей окрасок через искусственное растение при введении раствора, содержащего одновременно пиронин и метиленовую синь, при концентрации каждого красителя 0,5‰.

LA MIGRATION DE LA PYRONINE ET DU BLEU DE MÉTHYLÈNE DANS LES TIGES DE BALSAMINES ET DE TOMATES

THÉORIE ADSORPTIVE DE LA MIGRATION DES SUBSTANCES DANS LES PLANTES

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié la migration de la pyronine et du bleu de méthylène dans les tiges de balsamines et de tomates, en introduisant le colorant dans les plantes par la méthode capillaire. On a constaté que la migration de la pyronine est plus rapide que celle du bleu de méthylène et que la vitesse de migration des deux solutions colorantes n'est pas influencée par l'intoxication préalable des plantes à l'arséniate de sodium. Etant donné que ces faits d'expérience ne peuvent être interprétés à l'aide des théories existantes sur le mécanisme de migration des substances et des solutions dans la plante (les théories osmotique et métabolique), les auteurs en ont élaboré une nouvelle : la théorie adsorptive, dont les principes reposent sur les recherches expérimentales effectuées à l'aide d'un dispositif pouvant être considéré dans une certaine mesure comme un modèle physico-chimique de la plante et denommé «plante artificielle». Conformément à la théorie adsorptive, le système conducteur de la tige se comporte dans certaines circonstances comme une sorte de colonne d'adsorption le long de laquelle la migration des différentes solutions et substances s'effectue d'après les règles et les lois de la chromatographie. Bien qu'un certain parallélisme paraît exister entre les phénomènes constatés sur les plantes et sur la colonne d'adsorption, des différences fondamentales les séparent, dues tant à la nature biologique des plantes, qu'aux conditions dans lesquelles se produit la migration des substances.

Admettre la théorie adsorptive sur la migration des substances dans les plantes n'est pas nécessairement repousser les théories osmotique et métabolique, car la migration des substances dans la plante est trop complexe pour pouvoir être limitée, dans son ensemble, à l'intervention d'un seul facteur : osmotique, métabolique ou adsorptif.

EXPLICATIONS DES FIGURES

Fig. 1. — Schéma d'un essai utilisant la méthode capillaire.

Fig. 2. — Migration du colorant rouge dans les faisceaux conducteurs des tiges de balsamines et de tomates lors de l'introduction, par la méthode capillaire, d'une solution de pyronine à 0,5‰.

Fig. 3. — Migration du colorant bleu dans les faisceaux conducteurs des tiges de balsamines et de tomates lors de l'introduction, par la méthode capillaire, d'une solution de bleu de méthylène à 0,5 $^0/_{00}$.

Fig. 4. — Migration des colorants rouge et bleu dans les faisceaux conducteurs des tiges de balsamine lors de l'introduction, par la méthode capillaire, d'une solution de pyronine à 0,5$^0/_{00}$ dans deux plantes de balsamine et d'une solution de bleu de méthylène à 0,5$^0/_{00}$ dans deux autres.

Fig. 5. — Migration du colorant rouge et bleu dans les faisceaux conducteurs d'une tige de balsamine lors de l'introduction d'une solution contenant à la fois de la pyronine et du bleu de méthylène, chacun à 0,5$^0/_{00}$.

Fig. 6. — Migration des colorants rouge et bleu dans les faisceaux conducteurs des tiges de balsamine témoin (traitée à l'eau) et de balsamine traitée à l'arsénite de sodium, lors de l'introduction , par la méthode capillaire, d'une solution contenant à la fois de la pyronine et du bleu de méthylène, chacun à 0,5$^0/_{00}$.

Fig. 7. — Migration des colorants rouge et bleu dans les faisceaux conducteurs d'une tige de balsamine témoin (traitée à l'eau) et de balsamine intoxiquée à l'arsénite de sodium lors de l'introduction, par la méthode capillaire, d'une solution contenant à la fois de la pyronine et du bleu de méthylène, chacun à 0,5$^0/_{00}$. Consommation d'oxygène dans les tiges des deux plantes.

Fig. 8. — Migration de la pyronine (*P*), du bleu de méthylène (*Am*) et de leur mélange (*P* + *Am*) sur papier Whatman 1 en conditions de chromatographie ascendante. Le liquide d'irrigation était l'eau faiblement acidulée (pH = 6,0 — 6,5).

Fig. 9. — Schéma de l'expérience sur la plante artificielle. *A* — plante artificielle ; *B* — plante artificielle à la mêche montée ; *C* — migration des colorants lors de l'introduction, par la méthode capillaire, d'une solution contenant à la fois de la pyronine et du bleu de méthylène, chacun à 0,5$^0/_{00}$.

Fig. 10. — Migration des colorants rouge et bleu dans la plante artificielle lors de l'introduction d'une solution contenant à la fois de la pyronine et du bleu de méthylène, chacun à 0,5$^0/_{00}$.

BIBLIOGRAFIE

1. E. MACOVSCHI, *Metoda capilară pentru introducerea compușilor chimici și produșilor biologici în corpul plantelor.* Com. Acad. R.P.R., **8**, *2*, 183—187 (1958).
2. E. MACOVSCHI, *Metoda capilară și aplicațiile ei în biochimia plantelor.* Volumul omagial Traian Săvulescu, Ed. Acad. R.P.R., 1073—1076 (1958).
3. А. Л. КУРСАНОВ, *Взаимосвязь физиологических процессов в растении. Тимирязевские чтения, XX.* Издательство Академии Наук СССР, Москва, 7 и 8 (1960)
4. А. Л. КУРСАНОВ, *Современная физиология растений и перспективы ее развития.* Известия Академии Наук СССР, серия биология, *2*, 195 (1961).
5. E. MÜNCH, *Die Stoffbewegung in der Pflanze*, Jena, 1930.
6. L. BAUER, *Zur Frage der Stoffbewegung in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen.* Planta, 349 (1957).
7. K. ESAU, H. CURRIER, V. CHEADLE, *Physiologie of phloem.* Ann. Rev. Plant. Physiol., **8**, 349 (1957).
8. M. ZIMMERMAN, *Translocation of organic substances in the phloem of trees.* The physiologie of forest trees. Symposium. Romeeld Press Comp. N. Y., 381 (1958).
9. А. Л. КУРСАНОВ, *Движение органических веществ в растении.* Бот. журн. **37**, 586 (1952).
10. А. Л. КУРСАНОВ М. В. ТУРКИНА, *Дыхание проводящих тканей и движение сахарозы.* Д.А.Н. СССР, **85**, *3*, 649—652 (1952).
11. А. Л. КУРСАНОВ М. В. ТУРКИНА, *Дыхание сосудисто-волокнистых пучков* ДАН СССР, **84**, *5*, 1073—1076 (1952).
12. W. SCHUMACHER, M. HÜLSBRUCH, *Zur Frage der Bewegung fluoreszierender Farbstoff im Pflanzenkörper.* Planta, **45**, 118 (1955).
13. J. WILLENBRINK, *Über die Hemmung des Stofftransports in den Siebröhren durch lokale Inaktivierung verschiedener Atmungsenzyme.* Planta, **48**, 3 (1957).
14. О. А. ПАВЛИНОВА, *Метаболизм проводящих тканей.* Известие Академии Наук СССР, серия биологическая, *2*, 239—245 (1961).
15. S. CHEN, *Simultaneous movement of P^{32} and C^{14} in opposite directions in phloem tissue.* Amer. J. Bot., **38**, 203 (1951).

16. L. P. VERNON, S. ARONOFF, *Metabolism of Soybean leaves. IV. Translocation from soybean leaves.* Arch. Biochem., **36**, 383 (1952).
17. C. A. SWANSON, J. B. WHITNEY, *Studies on the translocation of foliar applied P^{32} and other radioisotopes in bean plant.* Am. J. Botany, **40**, 816 (1953).
18. O. BIDDULPH, S. F. BIDDULPH, R. A. CORY, *Translocation studies in phloem with the simultaneous use of tritiumlabelled water, $Carbon^{14}$, $Phosphorus^{32}$ and microautoradiograms.* Internat. Confer. on Radioisotopes in sc. research. UNESCO, 1957.
19. C. NELSON, P. GORHAM, *Translocation of C^{11} labelled aminoacids and amids in the stems of young soybean plants.* Canad. J. Bot., **37**, 431 (1959).
20. E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI, L. BOTOŞĂNEANU, *Factorii fizico-chimici şi metabolici în transportul diferitelor soluţii în plante.* Studii şi cercet. de biochimie, **4**, 427—447 (1961).
21. A. L. KURSANOV, *Recent advances in plant physiology in U.R.S.S.*, Ann. Rev. Plant. Physiol., **7**, 401 (1956).
22. H. ZIEGLER, *Über die Atmung und den Stofftransport in den isolierten Leitbündeln der Blattstiele von Heracleum mantegazzianum.* Planta, **51**, 186 (1958).
23. М. В. ТУРКИНА, *Абсорбция сахарозы сосудисто-волокнистыми пучками сахарной свеклы.* Физиол. растений, (в печати).
24. O. BIDDULPH , S. F. BIDDULPH, R.A. CORY, H. W. KOONTZ, *Paper presented at A.A.A.S.* Pacific Coast Meet. June, 1954.
25. J. VAN OVERBEK, *Absorption and translocation of plant regulators.* Ann. Rev. of Plant Physiol., **7**, 365 (1956).

CERCETĂRI ASUPRA FRACȚIUNILOR PROTEICE DIN SÎNGELE MATERN, DIN SÎNGELE NOULUI NĂSCUT ȘI DIN COLOSTRU LA CAPRE

DE

D. GH. POPOVICI și V. V. MICUȘAN

Corespondența dintre proteinele serice și cele din laptele colostral a fost studiată de diferiți autori [1], [2], [3]. Cercetări efectuate pe o vacă în lactație, la care s-au injectat intravenos doze de 20 mc $Na_2{}^{14}CO_3$ au arătat că încorporarea ^{14}C în albumina serică, imunoglobulinele și γ-cazeina din lapte se face într-o proporție asemănătoare cu aceea din proteinele serice.

Datele au dus la concluzia că aceste proteine provin direct din circuitul sangvin. În același mod, după cantitatea de ^{14}C încorporat în α-lactalbumină, β-lactoglobulină, α- și β-cazeină, se constată că aceste proteine din lapte sînt sintetizate în glanda mamară din fondul comun de aminoacizi liberi [1].

Cu toate acestea, aspectul trecerii proteinelor din sînge în secrețiile lactate nu a fost bine lămurit. De asemenea nu se cunosc suficient nici legăturile existente între proteinele sangvine și colostrale și nici influența lor asupra dezvoltării noului născut.

Ținînd seama de raporturile complexe care există între proteinele serice ale organismului matern și ale fetus-ului și între proteinele colostrale și proteinele serice ale noului născut, în lucrarea de față ne-am propus să studiem, la capre, modificările fracțiunilor proteice din sîngele matern, din sîngele noului născut și din colostru. S-au cercetat numai proteinele din zerul de colostru, întrucît în primele zile de la fătare zerul conține o cantitate foarte mare de proteine, dintre care imunoglobulinele sînt în proporția cea mai mare. De asemenea am urmărit influența alimentației cu colostru asupra dezvoltării proteinemiei noilor născuți și asupra reactivității lor imunologice.

METODE DE LUCRU

Proteinele din serul sangvin al caprelor și iezilor, și cele din colostru s-au urmărit la diferite intervale. Recoltările de sînge s-au făcut la capre din vena jugulară, la 30 de zile și la 10 zile înainte de fătare, imediat la fătare și la 24 de ore, 10 zile și 30 zile după fătare. La iezi, recoltările de sînge s-au făcut la fătare și la 24 de ore, 10 zile, 30 zile și 60 zile după fătare. După separarea serului, acestuia i s-a determinat indicele de refracție, la maximum 3 ore de la prelevare, în scopul calculării proteinemiei. S-a folosit un refractometru tip Zeiss, determinările fiind făcute la 17°, 5 C. Modificările diferitelor fracțiuni proteice s-au urmărit prin metoda analizei electroforetice pe hîrtie. Am întrebuințat pentru acest scop un aparat de electroforeză tip Juan, folosind un tampon veronal sodic-acetat de pH 8,6 și forță ionică $\mu = 0{,}1$. Tensiunea electrică era de 5 V/cm, intensitatea de 0,5 m A/cm. Migrările s-au făcut pe hîrtie Schleicher-Schüll 2043 bMgl timp de 14 ore. După uscarea benzilor, colorarea s-a făcut cu albastru de bromfenol după formula lui Durrum citat de M. Idu și S. Cîmpeanu [4]. Determinările cantitative s-au făcut prin metoda eluției [4] iar citirile cu spectrofotometrul Zeiss, model VSU 1, lungimea de undă 600 mμ. Proteinele din zer s-au cercetat tot electroforetic, fiind obținute după precipitare la punctul izoelectric cu acid acetic 10%. Din cauza concentrației mari în proteine, zerul a fost diluat 1 :4, realizîndu-se o concentrație de 2,5 g/100 ml. Condițiile tehnice au fost aceleași ca în cazul electroforezei proteinelor serice.

Urmărirea modificărilor fracțiunilor proteice la nou-născuți le-am făcut pe trei animale. Doi dintre iezi au fost gemeni și au suferit tratamente diferite. Unul dintre ei a primit colostru imediat după fătare, al doilea a fost privat de colostru, fiind hrănit în primele 24 de ore cu lapte de capră normal. Un regim alimentar identic a fost aplicat celui de-al treilea ied. După 24 de ore, iezii au fost hrăniți în continuare cu lapte colostral și au fost supuși aceleiași îngrijiri ca și iedul care a primit colostru începînd de la fătare.

Pentru cercetarea reactivității imunologice, doi iezi, unul hrănit imediat după fătare cu lapte colostral iar altul lipsit 24 de ore de colostru, s-au imunizat față de proteinele din serul uman normal. Doza administrată a fost de 1250 mg proteină în asociație cu adjuvant Freund, subfracționată în 8 injecții subcutane, de la vîrsta de 2 luni la 3 luni.

Imunoelectroforeza s-a efectuat după micrometoda Scheidegger [5] în tampon veronal — veronal sodic la pH 8,6, forța ionică a tamponului în cuvă fiind de 0,05, iar în plăci de 0,035. S-a folosit un gel de agaroză 1,5% [6]. Potențialul 20 V/cm; intensitatea 1,0 mA/cm, durata migrării 4 ore. Imunodifuzia s-a făcut la temperatura laboratorului, plăcile fiind apoi prelucrate după metodele curente [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analizînd rezultatele obținute prin electroforeza proteinelor din serul sangvin de capră gestantă (tabela 1) se observă o pronunțată creștere a γ-globulinelor însoțită de o scădere relativă a conținutului în albumină cu

30 de zile înainte de fătare (figura 1, banda *3*). Valorile celorlalte fracțiuni globulinice nu suferă modificări importante în intervalul cercetat. Fracțiunea β-globulinică este ușor crescută înainte de fătare, fapt ce poate fi pus în legătură cu acumularea de anticorpi care se fixează nu numai pe fracțiunile γ-globulinice, ci și pe β-globuline. Rezultatele electroforegra-

Tabela 1

Variațiile fracțiunilor proteice sangvine și ale raportului albumine/globuline, la capră, înainte și după fătare, exprimate în valori relative (%) și absolute (g/100 ml ser) *)

Data recoltării de sînge	Albumine		α_1-Globuline		α_2-Globuline		β-Globuline		γ-Globuline		Album. Glob.
	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	
30 de zile înainte de fătare	34,7	2,38	9,5	0,65	8,8	0,60	9,1	0,62	37,9	2,63	0,52
10 zile înainte de fătare	46,8	3,20	11,3	0,78	10,8	0,74	7,9	0,54	23,2	1,58	0,88
La fătare	49,2	3,34	12,2	0,83	11,1	0,76	8,3	0,56	19,2	1,31	1,12
24 de ore după fătare	47,6	3,24	12,3	0,83	11,9	0,80	9,1	0,60	19,1	1,31	0,92
10 zile după fătare	50,9	3,40	11,7	0,78	10,2	0,61	7,4	0,50	20,8	1,34	1,03
30 zile după fătare	53,0	3,55	10,9	0,73	10,1	0,67	7,2	0,74	18,8	1,28	1,16

*) Cifrele reprezintă media a două animale.

melor, exprimate atît în valori relative (%) cît și absolute (g/100 ml ser), arată că în apropiere de și după fătare variațiile proteinelor serice urmează un singur sens, acela al revenirii la valorile normale caracteristice speciei (figura 1, banda *4*).

Raportul albumine/globuline este subunitar (0,52) la 30 de zile înaintea fătării, revenirea se face treptat și acest raport devine supraunitar în momentul fătării, crescînd apoi în același sens pînă la atingerea valorilor normale (1,16).

Aceste constatări confirmă rezultatele găsite de B. L. Larson [2] în cazul vacilor gestante. Acumularea β-globulinelor și îndeosebi a γ-globulinelor în sîngele animalelor gestante studiate este în strînsă legătură cu pregătirea activității secretorii a glandei mamare. Creșterea globulinelor purtătoare de anticorpi are loc cu cîteva săptămîni înainte de fătare, atingînd, după specie, o valoare maximă în intervalul de 4—6 săptămîni. Aceste fapte trebuie privite din punctul de vedere al modului de transmitere a imunității la noul născut. La caprine, ca și la bovine, placenta de tip sindesmocorial constituie un baraj pentru anticorpi, imunizarea noului născut făcîndu-se prin intermediul colostrului, ceea ce explică fenomenul

fiziologic de acumulare a globulinelor purtătoare de anticorpi în sîngele matern, înainte de fătare.

Deşi s-au făcut studii privind aspectul calitativ şi cantitativ al trecerii proteinelor sangvine în secreţiile lactate [3] rezultatele sînt departe de a fi satisfăcătoare. R. Hansen şi P. Phillips [8] au arătat că globulinele imune din sîngele matern sînt similare cu fracţiunea imunoglobulinică din colostru şi lapte.

Lucrările lui E. Smith [9], [10] duc la concluzia că imunoglobulinele din colostru şi lapte, deşi asemănătoare ca mobilităţi electroforetice cu γ-globulinele serice, au o distribuţie calitativă diferită a aminoacizilor care le compun. Alţi autori [3] folosind tehnica atomilor marcaţi, ajung la concluzia că imunoglobulinele trec din sînge în lapte, fără degradare sau resinteză.

La electroforeza proteinelor din zerul precolostral s-au găsit trei fracţiuni bine delimitate. Conform nomenclaturii actualmente în vigoare, acestea sînt în ordinea electronegativităţii : serumalbuminele, β-lactoglobulina şi imunoglobulinele. Din tabela 2 se observă că atît la precolostru cît şi la colostru fracţiunea cu cea mai mare concentraţie o formează imunoglobulinele, urmate de β-lactoglobulina şi într-o cantitate mai mică, de serumalbumine. Concentraţiile imunoglobulinelor şi β-lactoglobulinei se modifică într-un ritm rapid, raportul lor inversîndu-se la scurt timp după fătare. Această inversare coincide cu sfîrşitul perioadei colostrale şi marchează trecerea spre secreţia laptelui normal. Serumalbuminele scad foarte repede, încît în laptele normal ele nu se mai pot identifica electroforetic (figura 2, benzile *5*, *6*, *7*, *8*). Fracţiunea dominantă în zerul laptelui de capră este β-lactoglobulina.

Tabela 2

Variaţia serumalbuminelor, β-lactoglobulinei şi a imunoglobulinelor din zerul de lapte de capră la începutul lactaţiei, exprimate în valori relative (%)*

Data determinării	Serum-albumine %	Lacto-globuline %	Imuno-globuline %
10 zile înainte de fătare (precolostru)	4,4	21,3	74,3
La fătare	2,5	21,4	76,1
24 ore după fătare	4,2	29,6	66,2
3 zile după fătare **)	1,9	67,2	30,9
10 zile după fătare	—	84,4	15,6
30 de zile după fătare	—	95,2	4,8

*) Cifrele reprezintă media a două animale.
**) Cifrele reprezintă valorile aflate la un singur animal.

Urmărind schimburile rapide ce au loc în concentraţia imunoglobulinelor se reliefează marea lor importanţă pentru noul născut. Purtătoare de anticorpi, ele sînt pentru animalul tînăr singura sursă de anticorpi la primul său contact cu lumea exterioară şi îi conferă rezistenţa necesară împotriva agenţilor patogeni.

Pentru urmărirea influenţei laptelui colostral asupra modificărilor proteinelor serice la iezi în cursul dezvoltării lor, animalele s-au hrănit

imediat după fătare cu colostru, în mod diferit (vezi metodica). Analizînd variaţia proteinelor serice totale imediat după fătare şi pînă la vîrsta de 60 de zile, se constată o diferenţă semnificativă între animalul care a ingerat colostru imediat la fătare şi acelea care au primit colostru abia după 24 de ore (figura 3).

Iezii gemeni, supuşi la tratamente diferite în alimentaţia cu colostru, au avut la fătare aceeaşi proteinemie — 4,55 g/100 ml ser. În timp ce la iedul hrănit cu colostru proteinemia creşte simţitor, cu 13% în primele 24 de ore de la ingestie, la iedul hrănit cu lapte normal ea se menţine constantă. Abia după ce şi acesta a început să primească colostru, are loc o creştere cu 2% a proteinemiei serice totale. La iedul hrănit cu colostru primar, proteinele din serul sangvin continuă să crească atingînd valori asemănătoare cu ale animalului adult, în jurul vîrstei de 30 de zile (6,72 g/100 ml ser). Iedul lipsit de colostru timp de 24 de ore prezintă şi el o creştere a proteinemiei avînd însă întotdeauna valori mai scăzute (4,87 g/100 ml ser la 30 de zile). Greutatea corporală a acestuia, deşi egală la început cu a fratelui geamăn, a suferit o scădere care s-a compensat abia în apropierea vîrstei de 30 de zile, cînd animalul a trecut de la alimentaţia exclusivă cu lapte la o alimentaţie mixtă (lapte + raţie normală de creştere).

Aceeaşi linie de dezvoltare a suferit şi cel de-al treilea ied supus tratamentului de înlocuire a laptelui colostral cu lapte normal în primele 24 de ore. Spre deosebire de iezii gemeni, proteinemia iniţială a acestuia a fost, la fătare de 4,80 g/100 ml. El va păstra această diferenţă în tot timpul dezvoltării sale, după cum rezultă din figura 3.

Datele obţinute din electroforeza serului sangvin al iezilor imediat după fătare arată absenţa γ-globulinelor (figura 4, banda *13* şi figura 5, banda *16*). Acest fapt confirmă că şi la această specie, întocmai ca şi la viţeii nou născuţi serul sangvin nu conţine γ-globuline dozabile electroforetic.

Din tabela 3 rezultă că apariţia γ-globulinelor în sîngele animalului hrănit imediat după fătare cu colostru este rapidă şi în cantitate atît de mare încît inversează raportul albumine/globuline. Din supraunitar, caracteristic speciei, acest raport devine subunitar (figura 4, banda *14*). Celelalte fracţiuni, α_1- ; α_2-şi β-globulinele nu variază semnificativ în perioada cercetată. O dată cu creşterea animalului, valorile procentuale relative şi absolute ale fracţiunilor proteice serice cît şi raportul albumine/globuline, se apropie de acelea ale animalelor mature (figura 4, banda *15*).

Iezii care au fost lipsiţi de colostru în primele 24 de ore au prezentat o comportare deosebită (tabela 3). La aceştia, deşi au primit colostru după 24 de ore de la fătare, nu se observă apariţia γ-globulinelor într-o cantitate măsurabilă electroforetic (figura 5, benzile *16—20*). Fracţiunea γ-globulinică apare abia în a patra săptămînă de la fătare, păstrîndu-se atît ca valori relative cît şi absolute, mai mică decît în cazul hrănirii cu colostru imediat de la fătare. Se observă şi o creştere uşoară a fracţiunilor α-globulinice, care însă pe măsura creşterii animalelor se apropie de acelea ale animalului hrănit normal. Nu se constată variaţii la fracţiunea β-globulinică care îşi păstrează în general aceeaşi proporţie ca şi la fătare.

Raportul albumine/globuline, deplasat iniţial mult în favoarea albuminelor, tinde spre valori normale o dată cu apariţia γ-globulinelor. După 60 de zile de la fătare, valorile raportului albumine/globuline sînt de 1,21 respectiv 1,23 — sensibil egale cu raportul 1,24 găsit la iedul hrănit cu colostru imediat de la fătare. Rezultă că, deşi avînd un nivel proteic mai scăzut în sînge, iezii lipsiţi de colostru timp de 24 de ore au totuşi o distribuţie proporţională a proteinelor serice.

Tabela 3

Variaţia fracţiunilor proteice sangvine şi ale raportului albumine/globuline la iedul (a) hrănit cu colostru şi la doi iezi (b şi c) hrăniţi în primele 24 de ore în loc de colostru cu lapte normal de capră; cifrele sînt exprimate în valori relative (%) şi absolute (g/100 ml ser)

Data recoltării de sînge		Albumine		α_1- globuline		α_2- globuline		β-globuline		γ-Globuline		Albumine / Globuline
		%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	
La fătare	a	62,2	2,90	14,2	0,63	12,1	0,53	11,5	0,49	—	—	1,76
	b	61,5	2,80	14,8	0,67	13,7	0,62	11,0	0,46	—	—	1,60
	c	63,0	3,05	15,8	0,76	13,1	0,63	8,1	0,36	—	—	1,74
La 24 de ore	a	45,0	2,35	8,5	0,44	10,3	0,53	6,5	0,34	29,7	1,52	0,83
	b	63,0	2,86	14,1	0,64	12,8	0,58	10,1	0,47	—	—	1,69
	c	62,8	3,06	14,0	0,68	13,2	0,64	10,0	0,50	—	—	1,68
La 10 zile	a	51,2	3,35	9,6	0,59	11,9	0,73	7,7	0,47	16,6	1,04	1,18
	b	51,5	2,40	19,4	0,90	18,8	0,87	10,3	0,48	—	—	1,07
	c	52,9	2,67	18,9	0,96	18,0	0,91	10,2	0,52	—	—	1,11
La 30 zile	a	55,8	3,76	13,6	0,91	10,4	0,81	6,7	0,45	13,5	0,80	1,27
	b	54,5	2,65	15,2	0,74	12,7	0,62	6,8	0,35	10,8	0,51	1,18
	c	54,0	2,96	16,3	0,88	12,8	0,70	7,0	0,38	9,9	0,56	1,17
La 60 zile	a	55,5	3,77	11,9	0,81	10,7	0,73	6,9	0,47	15,0	1,02	1,24
	b	54,8	2,85	13,0	0,68	12,2	0,63	7,7	0,40	12,3	0,64	1,21
	c	55,0	3,21	12,7	0,74	11,9	0,69	8,0	0,46	12,4	0,72	1,23

Problema apariţiei γ-globulinelor în sîngele ierbivorelor nou născute la cîteva ore după ingestia de colostru a fost studiată pe viţei [11], [12]. În cercetările noastre pe iezi am constatat că faptele se petrec în mod analog. Permeabilitatea intestinului de ied pentru imunoglobulinele din colostru durează cel mult 24 de ore după fătare. Din datele prezentate (tabela 3) rezultă că hrănirea în continuare cu colostru nu duce la apariţia imediată a γ-globulinelor în sînge.

Cercetările făcute pe iezi au arătat că la vîrsta de 2 luni iedul hrănit imediat cu colostru are o concentraţie înγ-globuline mult mai ridicată decît cel hrănit în primele 24 de ore cu lapte normal. Această diferenţă se poate explica, desigur, prin transferul imunoglobulinelor din colostru în sînge, însă ar fi posibil ca animalul hrănit cu colostru să posede o altă reactivitate imunologică, sintetizînd γ-globuline cu o intensitate mai mare decît animalul hrănit în primele 24 de ore ale existenţei sale cu lapte normal. Am comparat reactivitatea imunologică a acestor animale prin imunizarea lor cu doze identice de ser uman normal şi prin cercetarea imunoelectrofore-

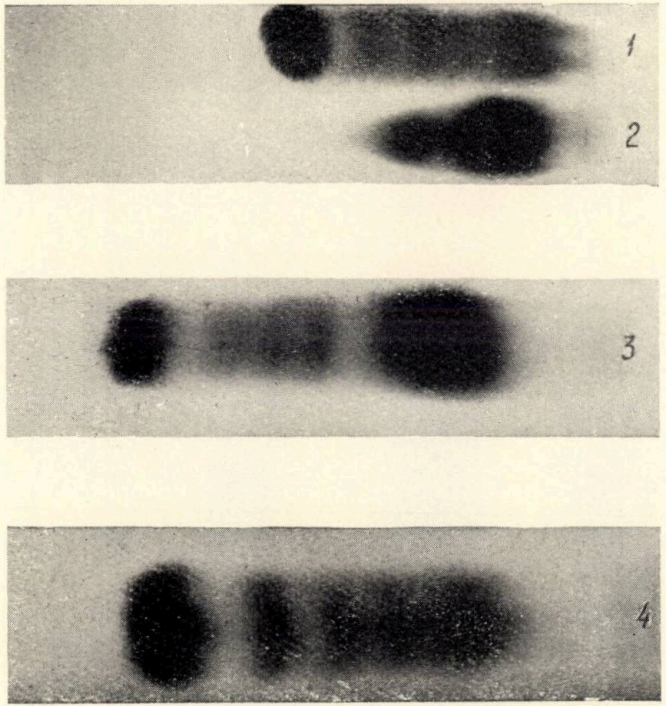


Fig. 1.—Electroforegramele proteinelor serice la capră înainte și după fătare.

(*1*, *2*) Compararea vitezei de migrare a proteinelor serice și a celor din zerul de colostru.

Proteinele serice cu 30 de zile înainte de fătare (*3*) și 10 zile după fătare (*4*).

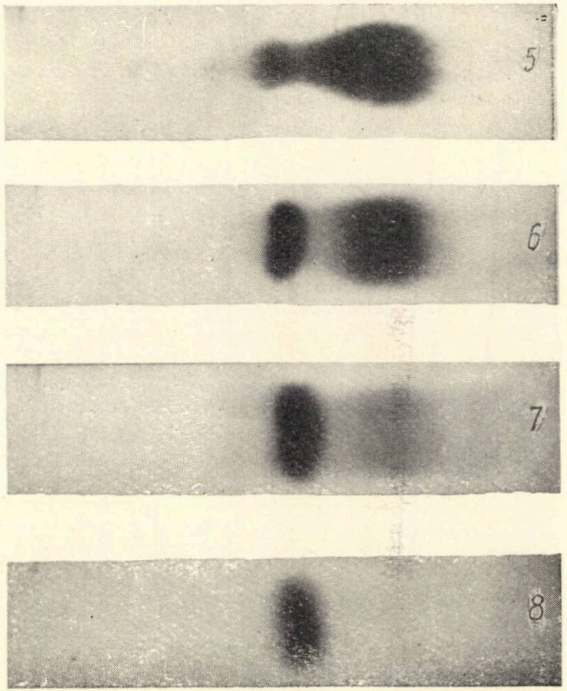


Fig. 2.—Electroforegramele proteinelor din zerul de lapte la capră la începutul lactației.

Proteinele din zerul de precolostru (*5*), la 3 zile (*6*), 10 zile (*7*) și 30 de zile (*8*) după fătare.

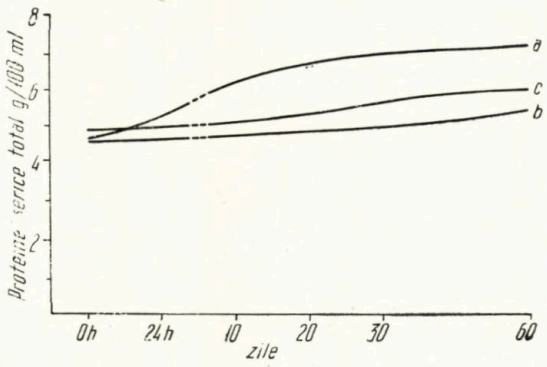


Fig. 3.—Creşterea proteinelor serice totale la iezii hrăniţi cu şi fără colostru în primele 24 de ore.

Iezii *a* şi *b* sînt gemeni, iedul *a* a primit colostru, iedul *b* a fost lipsit de colostru în primele 24 de ore. Iedul *c*, supus aceluiaşi tratament fără colostru.

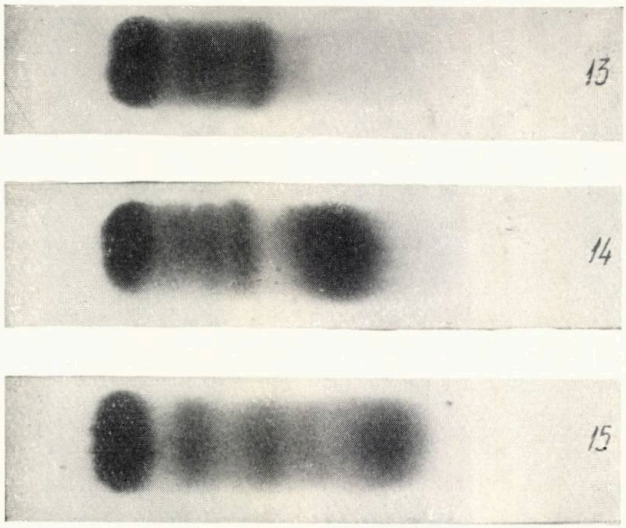


Fig. 4. — Electroforegramele proteinelor serice la iedul hrănit cu colostru de la fătare.

Proteinele serice la fătare (*13*), 24 de ore după ingestia de colostru (*14*) şi la vîrsta de 30 de zile (*15*).

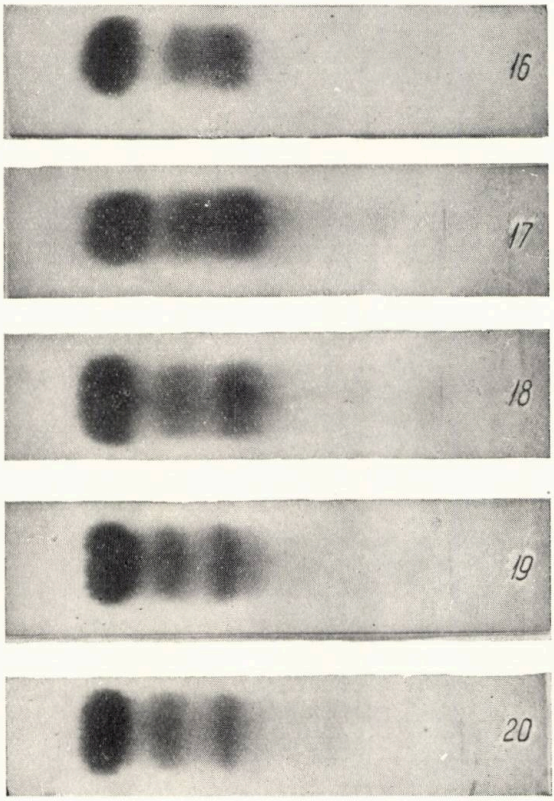


Fig. 5. — Electroforegramele proteinelor serice la iedul lipsit de colostru în primele 24 de ore şi hrănit în acest timp cu lapte normal de capră.

Proteinele serice la fătare (*16*), 24 de ore după ingestia laptelui normal (*17*), la 10 zile (*18*), 20 de zile (*19*) şi 30 de zile (*20*).

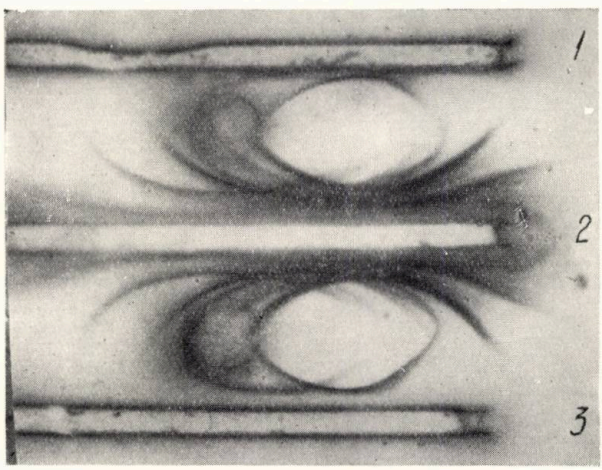


Fig. — 6. Imunoelectroforegrama serurilor de ied faţă de ser uman.

1. Ser antiom de la iedul hrănit cu lapte normal în loc de colostru timp de 24 de ore.

2. Ser antiom de iepure (titru 1/50 000).

3. Ser antiom de la iedul hranit cu colostru

tică a anticorpilor formaţi. Analiza imunoelectroforetică a serurilor provenite de la cei doi iezi arată că la ambii iezi anticorpii sînt localizaţi în special pe fracţiunea γ-globulinelor. O linie slabă de precipitare s-a putut evidenţia şi în zona β_2-globulinelor.

La intervalul de imunizare aplicat, animalele nu răspund cu anticorpi faţă de toţi componenţii serului uman. Cercetînd liniile de precipitare obţinute cu serurile de ied, în comparaţie cu un ser de iepure antiom cu titrul mare (1/50 000), s-au putut evidenţia la iedul hrănit cu lapte colostral imediat la fătare numai două linii de precipitare, una în zona α_2-globulinelor, iar alta în zona β_2-globulinelor.

Pentru iedul hrănit în primele 24 de ore cu lapte normal s-a identificat numai o singură linie de precipitare, în zona α_2-globulinelor (figura 6).

Aceste constatări arată că iezii studiaţi nu elaborează anticorpi faţă de componenţii majoritari ai proteinelor serice (albumine) nici faţă de componenţi puternic antigeni ca α_1-globulina (*14*) ci faţă de antigeni mai puţin importanţi, care însă reprezintă probabil, cenapse lipoproteice.

În ceea ce priveşte deosebirea constatată între cei doi iezi, numărul mic de animale studiat ne împiedică să tragem concluzia că hrana colostrală aduce şi o creştere a reactivităţii imunologice a animalelor nou născute. Cercetările în curs ne vor permite să tragem o concluzie definitivă.

CONCLUZII

1. La capra gestantă are loc, cu 4—6 săptămîni înainte de fătare, o acumulare de β- şi γ-globuline în sînge; o dată cu apropierea fătării, acestea scad, atingînd în jur de 10 zile după fătare valori normale pentru această specie.

2. Scăderea globulinelor purtătoare de anticorpi în sîngele caprei gestante are loc concomitent cu apariţia imunoglobulinelor în secreţia lactată primară, fapt care conduce la ipoteza trecerii lor, din sînge în glanda mamară, printr-un mecanism de permeabilitate şi nu de sinteză.

3. La caprine zerul de lapte conţine cantităţi importante de imunoglobuline, care scad foarte mult la cîteva zile după fătare.

4. La iezii nou născuţi, serul sangvin este deficitar în γ-globuline. Acestea apar la cîteva ore după ingestia de colostru.

5. Iezii care nu au primit colostru în primele 24 de ore prezintă o dezvoltare anormală, atît în ceea ce priveşte proteinemia totală cît şi în distribuţia procentuală a fracţiunilor proteice serice.

6. Imunizarea cu ser uman normal a iezilor hrăniţi în primele 24 de ore cu şi fără colostru a arătat un răspuns imunologic mai mare la cel hrănit imediat cu colostru. Concluzii definitive în legătură cu creşterea reactivităţii imunologice la animalele hrănite cu colostru se vor putea obţine la terminarea cercetărilor întreprinse în acest scop.

Prezentată la redacţie la 15 octombrie 1962

Laboratorul de biochimie,
Institutul de cercetări zootehnice,
Bucureşti

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ КРОВИ МАТЕРИ, КРОВИ НОВОРОЖДЕННОГО И МОЛОЗИВА КОЗЫ

РЕЗЮМЕ

При помощи электрофоретического метода авторы проследили за изменением белковых фракций кровяной сыворотки и молозива коз, в последнем месяце периода беременности и при начале лактации. За 3—4 недели до родов имеет место накопление β- и γ-глобулинов в крови; после достижения максимума, их содержание понижается и приближается к норме через несколько дней после родов. Это понижение β- и γ-глобулинов наблюдается одновременно с появлением иммуноглобулинов в молозиве. В сыворотке молозива главную белковую фракцию образуют иммуноглобулины (76,16%), содержание которых понижается во времени, так что к концу периода выделения молозива оно составляло лишь 15,6%.

У козлят, которым сейчас же после рождения давали молозиво, было констатировано наличие в кровяной сыворотке β-глобулинов, в результате проникновения сквозь стенки кишечника иммуноглобулинов молозива. Козлята, которым не давали молозива в течение 24 часов и которых кормили в это время обыкновенным молоком козы, не имеют γ-глобулинов. Последние появляются лишь на 30-ый день жизни козленка.

При иммунизации нормальной человеческой сывороткой, козлята реагировали по-разному; у козленка, которому давали молозиво сразу после рождения, замечена повышенная иммунологическая реакция.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофореграммы сывороточных белков козы до и после родов. (*1*, *2*). Сравнение скорости миграции сывороточных белков и белков сыворотки молозива. Сывороточные белки за 30 дней до родов (*3*) и через 10 дней после родов (*4*).

Рис. 2. — Электрофореграммы белков из сыворотки молока у козы в начале лактации. Белки из сыворотки до выделения молозива (*5*), на третий день (*6*), на десятый день (*7*) и на тридцатый день (*8*) после родов.

Рис. 3. — Рост общего содержания сывороточных белков у козлят, в питание которых входило молозиво, и лишенных его в первые 24 часа. Козлята *a* и *b* — близнецы, козленку *a* давали молозиво, а козленку *b* не давали его в течение первых 24-х часов. Козленка *c* питали также, но без молозива.

Рис. 4. — Электрофореграммы сывороточных белков у козленка, которому давали молозиво со дня рождения. Сывороточные белки при рождении (*13*), 24 часа после кормления молозивом (*14*) и на 30-ый день (*15*).

Рис. 5. — Электрофореграммы сывороточных белков у козленка, которому не давали молозива в течение первых 24-х часов и которого кормили в это время нормальным молоком козы. Сывороточные белки при родах (*16*), 24 часа после кормления нормальным молоком (*17*), на 10-ый день (*18*), на 20-й день (*19*) и на 30-ый день (*20*).

Рис. 6. — Иммуноэлектрофореграмма сывороток козленка в сравнении с сывороткой человека. *1.* Сыворотка anti-homo от козленка, вскормленного нормальным молоком вместо молозива в течение 24-х часов. *2.* Сыворотка anti-homo зайца (титр 1/50 000). *3.* Сыворотка anti-homo от козленка, вскормленного молозивом.

RECHERCHES SUR LES FRACTIONS PROTÉIQUES DU SANG MATERNEL, DU SANG DU NOUVEAU-NÉ ET DU COLOSTRUM CHEZ LES CHÈVRES

RÉSUMÉ

On a suivi par la méthode électrophorétique les modifications des fractions protéiques du sérum sanguin et du lait colostral des chèvres pendant le dernier mois de la gestation et au début de la lactation. A 3—4 semaines avant la mise bas il se produit une accumulation des β- et γ-globulines dans le sang, mais après avoir atteint une valeur maxima leur quantité baisse et se rapproche de la normale quelques jours après la mise bas. Cette baisse des β- et γ-globulines va de pair avec l'apparition des immuno-globulines dans le colostrum. Dans le petit-lait du colostrum la fraction protéique la plus importante est constituée par les immuno-globulines (76,1 %), dont la quantité diminue progressivement de sorte qu'à la fin de la période colostrale elles n'y représentent plus qu'une petite proportion (15,6 %).

Chez les chevreaux nourris au colostrum aussitôt après la mise bas on constate la présence des β-globulines dans le sérum sanguin, due au passage par la paroi intestinale ainsi qu'aux immuno-globulines colostrales. Les chevreaux privés de colostrum pendant 24 heures et nourris pendant ce temps au lait normal de chèvre ne possèdent pas de β-globulines ; celles-ci n'apparaissent qu'à 30 jours environ après la mise bas.

Soumis à l'immunisation au sérum humain normal, les chevreaux réagissent différemment ; une réactivité immunologique accrue a été observé chez le chevreau nourri au colostrum ausitôt après la naissance.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorégrammes des protéines sériques de la chèvre avant et après la mise bas.

(*1*, *2*) Comparaison de la vitesse de migration des protéines sériques et de celles du petit-lait de colostrum. Protéines sériques 30 jours avant la mise bas (*3*) et 10 jours après (*4*).

Fig. 2. — Electrophorégrammes des protéines du petit-lait de chèvre au début de la lactation. Protéines du petit-lait du précolostrum (*5*) 3 jours (*6*), 10 jours (*7*) et 30 jours (*8*) après la mise bas.

Fig. 3. — Accroissement des protéines totales du sérum chez les chevreaux nourris avec ou sans colostrum pendant les premières 24 heures. Les chevreaux *a* et *b* sont jumeaux, le chevreau *a* a reçu du colostrum, le chevreau *b* a été privé de colostrum pendant les premières 24 heures. Le chevreau *c* a été soumis au même traitement privé de colostrum.

Fig. 4. — Electrophorégrammes des protéines sériques du chevreau nourri au colostrum dès la naissance. Protéines du sérum lors de la mise bas (*13*), 24 heures après l'ingestion de colostrum et à l'âge de 30 jours (*15*).

Fig. 5. — Electrophorégrammes des protéines sériques du chevreau privé de colostrum pendant les premières 24 heures et nourri pendant ce temps au lait de chèvre normal. Les protéines du sérum à la naissance (*16*), 24 heures après l'ingestion du lait normal (*17*), 10 jours (*18*), 20 jours (*19*) et 30 jours (*20*) après.

Fig. 6. — Immuno-électrophorégramme des sérums de chevreau comparés au sérum humain. *1.* Serum anti-homme du chevreau nourri au lait normal au lieu de colostrum pendant 24 heures. *2.*Sérum anti-homme de lapin (titre 1/50 000). *3.* Sérum anti-homme de chevreau nourri au colostrum.

BIBLIOGRAFIE

1. B. L. LARSON, D. C. GILLESPIE, *Origin of the major specific proteins in milk*. J. Biol. Chem., **227**, 565 (1957).
2. B. L. LARSON, *Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition*. J.Dairy Sci., **41**, 1033 (1958).
3. B. A. ASKONAS, P. N. CAMPBELL, J. HUMPHREY, I. C. WORK, *The source of antibody globulin in rabbit milk and goat colostrum*. Biochem. J., **56**, 597 (1954).
4. S. M. IDU, S. CÎMPEANU, *Electroforeza*. Ed. medicală, Buc., 1957.
5. I. I. SCHEIDEGGER, *Une microméthode de l'immuno-electrophorèse*. Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
6. V. GHEŢIE, D. MOŢET-GRIGORAŞ, *Electroforeza şi imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*. Studii şi cerc. de biochimie, V, *3*, 409 (1962).
7. P. GRABAR, P. BARTIN, *Analyse immuno-électrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains*. Masson et Cie. Paris, 1960, 34, 37, 48.
8. R. G. HANSEN, P. H. PHILLIPS, *Studies on proteins from bovine colostrum*. J. Biol. Chem., **171**, 223 (1947).
9. L. E. SMITH, *The immune proteins of bovine colostrum*. J Biol. Chem., **164**, 345 (1946).
10. L. E. SMITH, A. HOLM, *The transfer of immunity to the new-born calf from colostrum*. J. Biol. Chem., **175**, 349 (1948).
11. H. F. DEUTSCH, V. R. SMITH, *Intestinal permeability to proteins in the new-born herbivore*. Am. J. Physiol., **191**, 271 (1957).
12. V. R. SMITH, E. S. ERWIN, *Absorption of colostrum globulins introduced direct by into the duodenum*. J. Dairy Sci., **42**, 364 (1959).

ANALIZA ELECTROFORETICĂ ŞI IMUNOELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR CITOPLASMATICE ÎN PROCESUL DEZVOLTĂRII FRUNZEI DE BOB (*VICIA FABA*)

DE

VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ

Într-o notă anterioară [1] am arătat că declanşarea procesului germinativ aduce importante schimbări în caracterul antigenic al restului embrionului *), determinînd micşorarea numărului de antigene care pot fi identificate cu un ser imun antirest embrion. În frunzele nou formate se constată, chiar la 25 zile de la începerea germinaţiei, persistenţa unor antigene care erau prezente în restul embrionului. Alături de acestea, în frunze există antigene organo-specifice, care apar pe măsura diferenţierii morfologice a acestui organ şi care reflectă, fără îndoială, specializarea lui funcţională. Evident, antigenele organo-specifice nu pot fi detectate prin serul imun antirest embrion, însă apariţia lor în procesul de morfogeneză am semnalat-o pe cale electroforetică [1].

Pentru cunoaşterea dinamicii formării antigenelor organo-specifice, caracteristice plantelor mature, era necesară studierea capacităţii antigenelor sintetizate în diferite faze ale dezvoltării frunzelor de a interacţiona cu anticorpi produşi faţă de complexul antigenic al frunzelor mature. Dedicată acestui scop, lucrarea de faţă, ca şi cea precedentă, urmăreşte cu ajutorul unor tehnici imunochimice adecvate, extinderea cercetărilor de imunoembriologie şi în domeniul plantelor.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe frunze de bob *(Vicia faba)* aflate în diferite faze de dezvoltare. În acest scop, s-au pus la germinat seminţe de bob în vase de vegetaţie, la temperatura camerei. Frunzele s-au recoltat fără peţiol, la diferite intervale de timp de la începerea germi-

*) În lucrările noastre am întrebuinţat pentru radiculă, tulpiniţă şi gemulă termenul de „restul embrionului".

nației. Plantele mai tinere de 11 zile nu erau răsărite, avînd dezvoltată numai gemula. În aceste cazuri, am avut grijă ca gemula recoltată să nu fie amestecată cu restul de tulpiniță.

Determinările imunochimice s-au efectuat cu ajutorul unor antiseruri de iepure, obținute prin imunizarea animalelor cu proteine din frunze a căror vîrstă a fost cuprinsă între 20—40 zile. Proteinele foliare au fost obținute prin triturarea masei verzi cu tamponul borat-fosfat de pH 7,8 [2], folosind un raport de extracție de 1 parte frunză/0,25 părți tampon. Pasta omogenă s-a trecut printr-un tifon, iar lichidul obținut a fost limpezit printr-o centrifugare de 11 800 g, 15 min. Cu supernatantul proaspăt preparat s-au imunizat iepurii intramuscular sau subcutan, în asociație cu adjuvant Freund. S-a introdus între 50—150 mg proteină, subfracționată în 7—14 doze, timp de 30—50 zile. Pentru analiza imunochimică s-au folosit numai serurile puternice, cu un titru precipitant cuprins între 1,0—2,0 μg/ml antigen. Titrurile s-au determinat prin metoda Uhlenhut [3].

Difuzia în gel s-a făcut după metoda O. Ouchterlony [4], iar imunoelectroforeza după micrometoda J. Scheidegger [5]. Analiza electroforetică și imunoelectroforetică s-a efectuat în tamponul borat-fosfat de pH 7,8 [2]. Concentrația tamponului în cuvă a fost de 0,14 M acid boric, iar în plăci de 0,042 M. S-a folosit un gel de agaroză 1,5% [6]. Potențialul 20 V/cm; intensitatea 0,8 mA/cm; durata migrării 3—4 ore. Imunodifuzia s-a făcut la temperatura camerei, prelucrarea plăcilor executîndu-se după metodele curente [7]. Colorarea plăcilor de electroforeză și imunoelectroforeză s-a făcut cu albastru de bromfenol și amidoschwarz 10 B, respectiv azocarmin B [7]. Determinarea cantitativă s-a efectuat cu ajutorul integratorului MFG-Berlin. Pentru identificarea liniilor de precipitare corespunzătoare diferitelor fracțiuni s-au folosit metodele indicate de J. Heremans [8]. Deoarece proteinele foliare dau uneori o reacție de precipitare nespecifică cu serul de iepure [9], s-a efectuat controlul specificității reacțiilor cercetînd în paralel interacțiunea dintre antigenul studiat și serul iepurilor hiperimunizați cu un antigen străin, animal (serumalbumină de bou).

Extragerea antigenelor din țesuturi în vederea analizei imunochimice s-a făcut cu tamponul borat-fosfat de pH 7,8, la care s-au adăugat, după indicațiile lui R. Heitefuss și colaboratori [10]: 1 M glucoză, 0,1 M sulfit de sodiu și 0,005 M mertiolat. S-a folosit un raport de extracție variabil, cuprins între 1 parte material vegetal/0,25—5 părți tampon, pentru a asigura în toate extractele o concentrație proteică asemănătoare, indiferent de faptul că țesuturile respective conțineau cantități variabile de proteină.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Seria de analize electroforetice ale proteinelor din frunzele de bob găsite în diferite faze de dezvoltare a fost începută prin precizarea spectrului proteic al gemulei, formațiune care, prin creștere și dezvoltare, dă naștere frunzelor plantulei. Rezultatele analizei electroforetice sînt înfățișate în tabela 1 și în figura 1. Distribuția fracțiunilor proteice în gemulă este similară cu cea observată într-o lucrare anterioară [1] pentru cotiledoane și restul embrionului luat în întregime; sînt prezente și aici componentele principale, legumina și vicilina, alături de fracțiunile minore, prelegumina și postvicilina. Spre deosebire de restul embrionului luat în întregime, în gemulă se evidențiază atît o altă repartiție cantitativă a fracțiunilor, cît și omogenitatea fracțiunii postvicilinice, separată în trei componente pentru restul embrionului [1]. Între formațiunile care alcătuiesc restul embrionului (radicula, tulpiniță și gemula) deosebirile sînt doar de ordin canti-

tativ; de aceea, analiza imunoelectroforetică comparativă a proteinelor extrase din radiculă + tulpiniță *), față de cele din gemulă, nu semnalează nici o deosebire (fig. 2). În aceste experiențe n-am reușit să evidențiem prezența unor antigene specifice în nici una din cele trei formațiuni ce alcătuiesc restul embrionului, ceea ce de altfel este în acord cu părerea exprimată într-o altă lucrare [1], că întreaga sămînță de bob are un „caracter antigenic unitar". Deplina clarificare a acestei probleme poate fi adusă numai prin cercetarea reacțiilor imunochimice încrucișate, cu antiseruri preparate față de proteinele extrase din gemulă, radiculă și tulpiniță.

Declanșarea procesului germinativ nu aduce decît modificări cantitative în proteinogramele obținute din gemula de 2, 4 și 6 zile (tabela 1).

Tabela 1

Variația proporției fracțiunilor electroforetice ale proteinelor din frunzele embrionare de bob în primele 6 zile de la începerea germinației *)

Durata germinației (zile)	Fracțiunile %			
	prelegumina	legumina	vicilina	postvicilina
0	urme	49	35	16
2	„	45	27	28
4	„	22	52	26
6	„	26	48	26

*) Fiecare valoare reprezintă media a 3 determinări.

În această perioadă, procese enzimatice deosebit de intense provoacă în celule hidroliza fracțiunilor proteice. Creșterea procentului relativ de vicilină și postvicilină în urma germinației nu înseamnă nicidecum că aceste fracțiuni se sintetizează pe socoteala celorlalte componente proteice. Dimpotrivă, vicilina și postvicilina sînt hidrolizate, însă cu o viteză mai mică decît legumina, fapt care se oglindește, într-o exprimare procentuală, printr-o creștere *aparentă* a fracțiunii ce se degradează cu o viteză mai mică. Exprimînd modificările în valori absolute (mg proteină/g material uscat), se elimină orice posibilitate de interpretare greșită, toate fracțiunile care compun complexul proteic al gemulei micșorîndu-și cantitatea pe măsură ce procesul germinativ avansează. Constatări similare am făcut și într-o altă lucrare [11].

Dacă în primele zile care preced germinația nu se constată modificări electroforetice însemnate, în schimb după 11 zile proteinograma suferă o schimbare notabilă. Se pun acum în evidență fracțiuni noi (*1*, *2*, *3* și *6*) cu o viteză de migrare electroforetică caracteristică și care nu se găsesc în citoplasma frunzelor mai tinere (fig. 1, tabela 2). Fracțiunile *4* și *5a* au mobilități electroforetice identice cu acelea ale fracțiunilor din gemulă, notate legumină și vicilină. Cu toate acestea, din punct de vedere imunochimic, sînt asemănătoare doar fracțiunea *4* și legumina [1]. Desigur că numai pe baza reacțiilor imunochimice încrucișate nu se poate atesta cu

*) Nu s-a putut stabili limita de separație între aceste două formațiuni, de aceea ele s-au analizat împreună.

certitudine prezența leguminei în frunze, totuși scăderea continuă a fracțiunii *4*, în acord cu micșorarea leguminei, semnalată în primele 6 zile ale germinației, lasă impresia că procesul de hidroliză a leguminei continuă în cursul dezvoltării frunzelor, aproape pînă la epuizarea ei (la 38 de zile,

Tabela 2

Variația proporției fracțiunilor electroforetice ale proteinelor din frunzele de bob, în diferite faze de dezvoltare *)

Vîrsta frunzelor (zile)	Fracțiunile %						
	1	2	3	4	5a	5b	6
11	urme	5	8	15	50	—	22
14	5	urme	8	17	56	8	6
18	5	„	6	20	60	9	—
23	—	—	6	13	69	12	—
38	—	—	urme	5	85	10	—

*) Fiecare valoare reprezintă media a 3 determinări.

fracțiunea *4* nu mai reprezintă decît 5% din proteina totală). Cît despre perechea vicilină — fracțiunea *5a*, nici nu poate fi vorba de identitate, proprietățile lor fizico-chimice și imunochimice fiind complet diferite. Fracțiunea *5a* reprezintă componentul *caracteristic*, majoritar al citoplasmei frunzelor de bob, fiind echivalentă cu așa-numita *fracțiune I*, descoperită în frunzele multor plante dicotiledonate [12].

Concomitent cu apariția fracțiunilor electroforetice noi, se constată dispariția fracțiunilor cu mobilitate electroforetică redusă care sînt prezente în gemulă *).

Raportul dintre fracțiunile proteice nu este însă constant, ci se schimbă în procesul de vegetație. Există o tendință de simplificare a complexului proteic din frunze, manifestată prin scăderea gradului său de heterogenitate electroforetică. La 38 de zile de la începerea germinației și pînă la încheierea procesului de vegetație, în frunzele plantelor de bob nu se pot evidenția decît fracțiunile *5a*, *5b* și *4*, ultimele două fiind prezente într-o cantitate mică.

O atenție deosebită merită fracțiunea *6*, care apare în celulele foliare o dată cu declanșarea procesului de fotosinteză, atinge o concentrație destul de mare (22%), însă se menține în celule doar cîteva zile. Repetînd experiențele, s-a constatat de fiecare dată că această fracțiune apare în momentul răsăririi plantelor și, deci, al declanșării procesului de fotosinteză, și că persistența ei în celulele foliare nu depășește o săptămînă. Persistența redusă a fracțiunii *6* ne face să credem că ea este mai degrabă un produs de hidroliză decît unul de sinteză, deoarece altfel dispariția ei rapidă ar rezulta din oprirea sintezei, ceea ce nu se potrivește cu această perioadă, cînd ritmul sintezei proteice în celulă este în creștere.

Indiferent de originea ei, hidrolitică sau sintetică, apariția fracțiunii *6* a fost legată în toate experiențele efectuate de declanșarea procesului fotosintetic. Modul în care s-au efectuat experiențele nu permite stabilirea unei legături cauzale indubitabile între fotosinteză și apariția fracțiunii *6*,

*) Aceste fracțiuni au fost evidențiate și în cotiledoane și restul embrionului luat în întregime, fiind denumite „fracțiuni postvicilinice" [1].

deoarece lasă loc şi presupunerii că apariţia acestei fracţiuni este determinată de procesele biochimice noi ce apar datorită dezvoltării plantei şi care nu depind de fotosinteză.

Pentru clarificarea acestei probleme am montat experienţele în următoarea variantă : s-au extras proteinele, atît din frunzele seminţelor germinate 8 zile la întuneric şi 2 zile la lumină, respectiv 14 zile la întuneric şi 2 zile la lumină, cît şi din frunzele seminţelor germinate 10 zile, respectiv 16 zile la întuneric. Frunzele de 10 zile au fost recoltate de pe plantule germinate în apă de robinet, în cutii Petri, iar cele de 16 zile de pe frunzele plantulelor germinate 10 zile în cutii Petri şi crescute apoi 6 zile în vase de vegetaţie.

Rezultatele analizei electroforetice şi imunoelectroforetice sînt înfăţişate în figura 3. Electroforeza semnalează prezenţa fracţiunii *6* atît la plantele care au crescut 10 zile la întuneric, cît şi la cele care au crescut 8 zile la întuneric, beneficiind apoi de 2 zile de lumină. Rezultate similare s-au obţinut pentru varianta cu 16 zile de întuneric, respectiv 14 zile de întuneric şi 2 zile de lumină. Dacă apariţia fracţiunii *6* ar fi determinată de fotosinteză, atunci ea ar fi fost prezentă numai în proteinogramele variantelor care au fost iluminate 2 zile. Cum fracţiunea *6* se întîlneşte şi la plante de aceeaşi vîrstă, însă care n-au primit de loc lumină, este clar că apariţia acestei fracţiuni *nu* este determinată de procesul de fotosinteză, ci decurge din alte procese biochimice, nelegate direct de fotosinteză.

Analiza imunoelectroforetică nu poate aduce precizări suplimentare pentru fracţiunea *6*, deoarece antiserurile folosite s-au obţinut cu proteine foliare din care această fracţiune lipsea (frunzele în vîrstă de 20—40 zile nu conţin fracţiunea *6*). Cele 2 zile de fotosinteză pe care le au variantele iluminate se repercutează totuşi în caracterul antigenic al frunzelor respective, fapt semnalat prin imunoelectroforeză (fig. 3).

Astfel, pentru varianta de 10 zile se pot evidenţia, la frunzele iluminate, două linii de precipitare în plus faţă de frunzele crescute la întuneric, ceea ce arată că la lumină s-au sintetizat două antigene care există în planta matură. Deoarece electroforegramele sînt identice la frunzele iluminate şi la cele neiluminate, este greu de apreciat dacă în acest caz are loc sinteza unor populaţii moleculare noi sau este, pur şi simplu, cazul unei restructurări a grupărilor determinante pe o populaţie moleculară preexistentă. Aceleaşi constatări se pot face şi pentru varianta de 16 zile, cu singura deosebire că în acest caz nu am putut evidenţia decît un antigen în plus la frunzele iluminate. Probabil că în intervalul de timp în care s-au efectuat experienţele celălalt antigen nu a dispărut, ci el nu a putut fi recunoscut prin antiserul cu titrul mai slab pe care l-am folosit în acest caz. Pentru această interpretare pledează şi complexitatea mai mică a imunoelectroforegramelor obţinute la 16 zile (fig. 3).

Rezultatele analizei imunoelectroforetice sînt în acord cu cercetările mai vechi ale lui S. Rosenblat-Lichtenstein (1913), R. Lieske (1916) şi M. E. Elmore (1928) (citaţi după [13]), care au arătat că starea de etiolare se reflectă în numărul de antigene proteice din materialul cercetat. Ei au atras atenţia asupra unor diferenţe, determinabile serologic, între formele incolore şi cele verzi ale algelor unicelulare. Rezultate diferite au

obținut S. G. Wildman, M. Parker și J. M. Campbell într-o lucrare nepublicată, efectuată în 1948 și citată în cartea lui J. Bonner [12]. Acești autori au arătat că proteinele citoplasmatice ale frunzelor etiolate sînt similare cu cele ale frunzelor verzi; chiar dacă frunzele etiolate pierd clorofila și o cantitate apreciabilă din proteinele cloroplastice, proteinele citoplasmatice nu prezintă modificări. În lumina datelor noastre, putem afirma că modificările fine ce se petrec la nivelul proteinelor citoplasmatice în procesul etiolării pot fi sesizate numai prin metodele imunochimice moderne, care se efectuează în geluri și care, evident, n-au putut să stea la dispoziția autorilor sus-menționați.

Modificările electroforetice ale proteinelor din frunză în cursul morfogenezei acestui organ au fost verificate și prin analiza imunoelectroforetică a extractelor obținute din gemula semințelor negerminate și din frunze recoltate de pe plante la 4, 11, 18 și 23 zile de la începerea germinației. În aceste analize s-a folosit un ser imun antifrunză bob. Rezultatele sînt înfățișate în figura 4.

Verificînd datele analizei electroforetice, observăm că nici imunoelectroforeza nu sesizează modificări importante în structura antigenică a frunzelor decît după 11 zile de la începerea germinației. După acest interval de timp, încep să se evidențieze antigenele caracteristice frunzei mature (*antigenele organo-specifice*). Procesul apariției lor debutează brusc și se desăvîrșește într-un interval de timp relativ scurt (12 zile). După această perioadă de stabilizare, caracterul antigenic al frunzelor nu suferă schimbări notabile în restul procesului de vegetație, imunoelectroforegramele proteinelor obținute din frunze de 38 zile fiind asemănătoare cu cele din frunzele de 23 zile.

Această constatare vine aparent în contradicție cu datele analizei electroforetice, care semnalează o scădere a numărului de fracțiuni la frunzele recoltate între 18—38 zile de la începerea germinației. Analiza imunoelectroforetică arată însă că nu poate fi vorba de dispariția *totală* a fracțiunilor amintite mai sus, ci numai de scăderea cantității lor sub limita de sensibilitate — și deci de recunoaștere — a metodei electroforetice.

Tot în acest fel se poate explica și prezența liniilor de precipitare în zona catodică a plăcilor de imunoelectroforeză (figurile 1 și 4), acolo unde prin mijloacele de colorare folosite nu am reușit să identificăm nici o fracțiune proteică. Ne aflăm în prezența unor antigene ce determină formarea anticorpilor specifici la animalul imunizat, deși se găsesc într-o cantitate neînsemnată, nedecelabilă electroforetic.

De altfel, se știe că un antiser nu reflectă niciodată cu fidelitate, cantitativ, amestecul de antigene care a fost injectat; o proteină prezentă doar în urme poate uneori declanșa formarea unei cantități mai mari de anticorpi decît un alt component al amestecului, prezent într-o cantitate mult mai mare. Acest fenomen a fost observat și în cazul imunizării iepurilor cu albuș de ou: 50% din anticorpii formați au fost dirijați contra unor constituenți proteici prezenți doar în urme în albușul de ou [14].

Analiza imunoelectroforetică, efectuată cu ajutorul serului imun antifrunză, confirmă înrudirea imunochimică dintre proteinele frunzei

Fig. 1. — Electroforeza proteinelor din gemula seminţelor negerminate şi din frunze, în diferite faze de dezvoltare.

A — Gemula seminţelor negerminate; *B* — frunza la 4 zile de la începerea germinaţiei; *C* — la 11 zile; *D* — la 23 zile; *E* — la 38 zile.

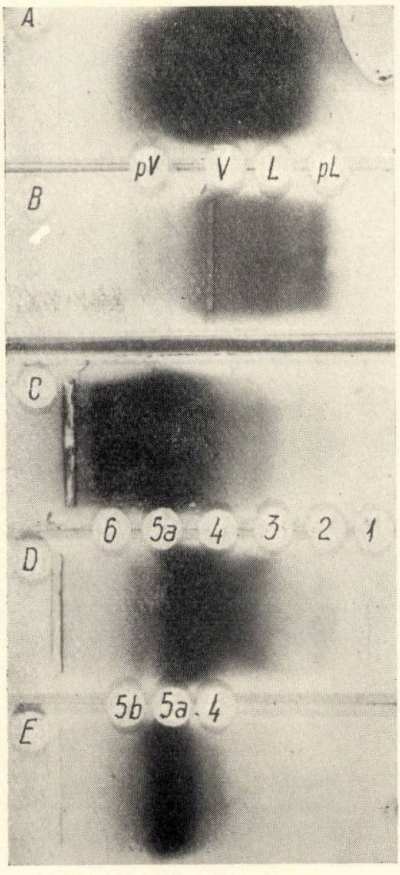
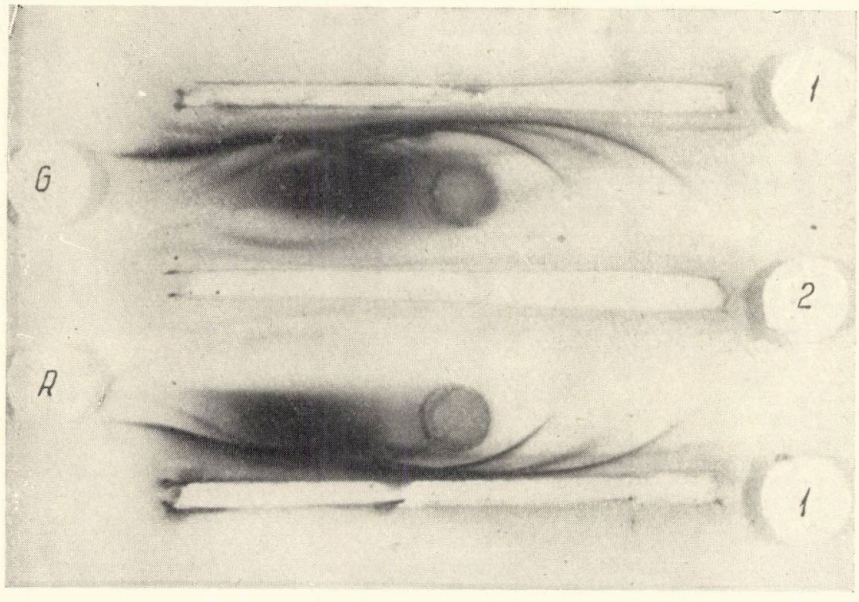


Fig. 2. — Imunoelectroforeza proteinelor din restul embrionului.

— Gemula; *R* — radicula + tulpiniţa; *1* — ser imun antirest embrion; *2* — ser imun antifrunză.



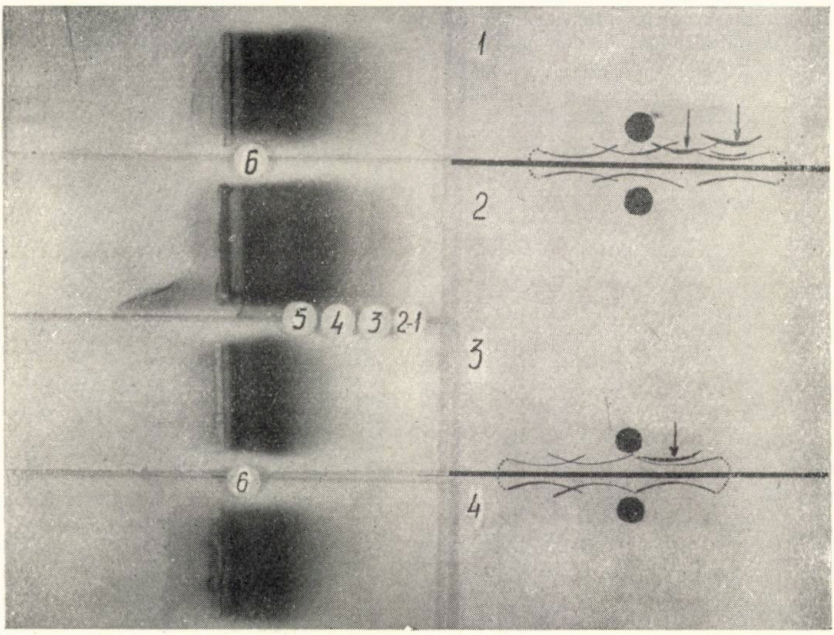


Fig. 3. — Electroforegramele şi imunoelectroforegramele proteinelor din frunzele de bob ţinute la întuneric şi lumină.

1 = 8 zile întuneric + 2 zile lumină; *2* = 10 zile întuneric; *3* = 14 zile întuneric + 2 zile lumină; *4* = 16 zile întuneric. Prin săgeţi s-au însemnat liniile de precipitare care apar în plus. Liniile de precipitare unite prin linii punctate au fost găsite asemănătoare prin metodele de identificare.

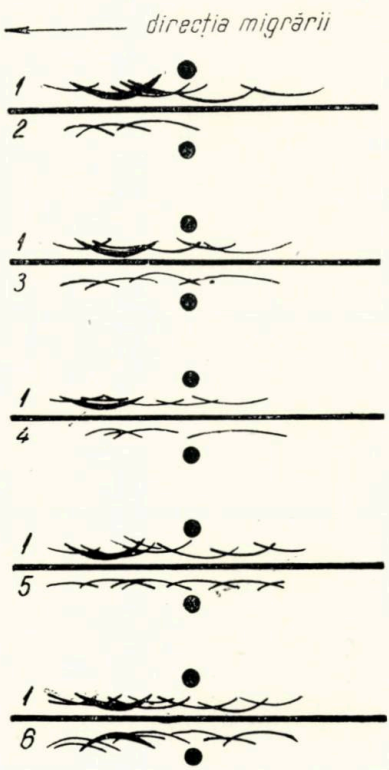


Fig. 4

Fig. 4. — Imunoelectroforegramele proteinelor din frunzele de bob în diferite faze de dezvoltare.

1 = Frunza matură; *2* = gemulă din sămînţa negerminată; *3* = frunză la 4 zile de la începerea germinaţiei; *4* = la 11 zile; *5* = la 18 zile; *6* = la 23 zile.

și cele ale restului embrionului, semnalată în lucrarea precedentă [1] cu ajutorul serului imun antirest embrion.

Din ultima figură se observă formarea unor linii de precipitare în zona de etalare a fracțiunilor legumina și vicilina. Acest fapt ne îndreptățește să considerăm că în frunze există fracțiuni proteice care au grupări determinante identice cu acelea din fracțiunile proteice ale gemulei. Nu se poate preciza dacă aceste grupări determinante se găsesc pe moleculele leguminei ori vicilinei, sau pe alte fracțiuni proteice, cu o mobilitate electroforetică similară celor două proteine, dar distribuite într-o cantitate mult mai mică. Mai mult decît atît, nu putem nici măcar preciza dacă înrudirea imunochimică constatată între frunza matură și gemulă are la bază antigene cu o individualitate chimică de sine stătătoare sau dacă ea se mărginește doar la existența unor grupări determinante identice, purtate însă de molecule diferite.

Înrudirea imunochimică dintre frunza matură și gemulă se poate constata și între frunza matură și celelalte părți ale restului embrionului (fig. 2), ceea ce ne face să considerăm că elementul înrudirii imunochimice amintite mai sus îl formează trei antigene posedate în comun de țesuturile frunzelor și de cele ale diferitelor părți ale embrionului (gemulă, radiculă, tulpiniță și cotiledoane).

Antigenele specifice frunzelor mature apar într-un anumit moment al dezvoltării lor, determinat probabil de complicarea metabolismului cu procese biochimice noi, în care și fotosinteza joacă, desigur, un anumit rol. Noi am reușit, prin mijloacele de investigație folosite, să sesizăm apariția acestor antigene *numai în momentul în care frunza a căpătat o structură morfologică caracteristică maturității*. Nu este totuși exclusă apariția lor mai timpurie, într-o perioadă care să preceadă diferențierea morfologică a frunzei, însă metodele imunochimice folosite de noi n-au putut releva acest lucru. De altfel, ambele posibilități au fost observate în experiențe pe animale, problema rămînînd încă controversată în imunoembriologia animală [15].

CONCLUZII

1. Deosebirile dintre proteinele extrase din formațiunile care alcătuiesc restul embrionului privesc doar distribuția cantitativă a fracțiunilor electroforetice. Analiza imunoelectroforetică, efectuată cu seruri antifrunză și antirest embrion, nu a evidențiat prezența unor antigene specifice în nici una din aceste formațiuni.

2. În primele zile ale germinației, procesul dominant este hidroliza proteinelor. Ea nu aduce însă modificări importante proteinogramelor, toate fracțiunile ce compun complexul proteic al gemulei micșorîndu-și cantitatea pe măsură ce procesul germinativ avansează. Aceste date au fost verificate și prin analiza imunoelectroforetică.

3. În perioada care urmează răsăririi plantelor, apar fracțiuni noi, cu mobilitate electroforetică caracteristică (*1*, *2*, *3* și *6*), și dispar fracțiunile cu mobilitate electroforetică redusă. Imunoelectroforetic se constată o

creștere a numărului de antigene sesizabile printr-un ser antifrunză matură, ceea ce arată că în această perioadă, pe măsura diferențierii morfologice a frunzelor, apar antigenele organo-specifice.

4. Apariția fracțiunii electroforetice *6* poate fi pusă pe seama proceselor hidrolitice, nefiind legată de declanșarea procesului de fotosinteză.

5. Procesul de fotosinteză inițiază în celulele frunzelor în dezvoltare sinteza unor antigene caracteristice frunzei mature. Este greu de apreciat dacă are loc sinteza unor molecule noi sau se petrece numai restructurarea unor grupări determinante pe molecule preexistente.

6. Antigenele organo-specifice apar în procesul dezvoltării în momentul în care frunza a căpătat structura morfologică caracteristică maturității. Încercări de evidențiere a acestor antigene în citoplasma celulelor, înainte de diferențierea morfologică a organului, nu au avut succes.

7. Între proteinele frunzei mature și cele ale gemulei și radiculei + tulpiniței există o înrudire imunochimică care se bazează pe existența a trei antigene posedate în comun de țesuturile frunzelor și ale restului embrionului.

Prezentată la redacție la 21 septembrie 1962

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ И ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ЦИТОПЛАЗМЫ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ЛИСТЬЕВ VICIA FABA

РЕЗЮМЕ

Белки листьев претерпевают значительные изменения в процессе развития растения. Если в первые дни прорастания можно отметить лишь количественные изменения существующих в почечке фракций (прелегумин, легумин вицилин и поствицилин), то, наоборот, после всхода (11 дней после начала прорастания) электрофоретическая картина резко меняется. Появляются новые фракции, обладающие характерной электрофоретической подвижностью (фракции *1*, *2*, *3* и *6*) и исчезают фракции слабо подвижные с электрофоретической точки зрения (поствицилин). Авторы считают, что появление шестой электрофоретической фракции, которая недолго остается в листьевых клетках, вызвана гидролитическим процессом, протекающим в клетках, независимо от фотосинтеза.

Процесс фотосинтеза вызывает появление в развивающихся клетках антиген, характерных для взрослого листа. Иммуноэлектрофоретическим путем выявляются лишние полосы осаждения на пробах, взятых из облученных два дня листьев, по сравнению с пробами, полученными из выдержанных в темноте листьев. Органоспецифические

антигены появляются в процессе развития, в момент, когда морфологическое строение соответствует характерному для полностью развитого листа. Помимо этих антигенов, в листьевых клетках было выявлено еще три антигена, встречающихся и в клетках образований зародыша. Они составляют общий элемент, определяющий перекрестные иммунохимические реакции между листьями и зародышем.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофорезис белков почечки непроросших семян и листьев на различных стадиях развития. *A* — почечка непроросших семян; *B* — лист спустя 4 дня после начала прорастания; *C* — спустя 11 дней; *D* — на 23-ий день; *E* — на 38-ой день.

Рис. 2. — Иммуноэлектрофорезис белков из остатка зародыша. *G* — почечка; *R* — росток + стебелек; *1* — иммунизированная сыворотка противоостаточного зародыша; *2* — противолистьевая иммунизированная сыворотка.

Рис. 3. — Электрофореграммы и иммуноэлектрофореграммы белков из листьев Vicia faba, выдержанных в темноте и на свету. 1 — 8 дней в темноте + 2 дня на свету; 2 — 10 дней в темноте; 3 — 14 дней в темноте + 2 дня на свету; 4 — 16 дней в темноте. Стрелками обозначены добавочные кривые осаждения. Методы определения выявили сходство между кривыми осаждения, связанными пунктиром.

Рис. 4. — Иммуноэлектрофореграммы белков из листьев Vicia faba в различных степенях развития. *1* — взрослый лист; *2* — почечка из непроросших семян ; *3* — лист на четвертый день от начала прорастания; *4* — на одинадцатый демь; *5* — на восемнадцатый день; *6* — на двадцать третий день.

ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE ET IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES CYTOPLASMATIQUES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE LA FEUILLE DE FÈVE (*VICIA FABA*)

RÉSUMÉ

Les protéines foliaires subissent d'importantes modifications au cours du développement de la plante. Si pendant les premiers jours de la germination on ne peut mettre en évidence que les modifications quantitatives des fractions existantes dans la gemmule (prélégumine, légumine, vicilline et post-vicilline), par contre après la levée des plantes (11 jours après le début de la germination), le tableau électrophorétique est complètement changé. De nouvelles fractions d'une mobilité caractéristique apparaissent (les fractions *1*, *2*, *3* et *6*), tandis que celles à mobilité électrophorétique réduite s'évanouissent (la post-vicilline). L'apparition de la fraction électrophorétique *6*, dont la persistance dans les cellules foliaires est restreinte, est considérée par les auteurs comme étant causée par un processus hydrolytique qui se déroulerait dans les cellules indépendamment de la photosynthèse.

Le processus de photosynthèse détermine, dans les cellules des feuilles en voie de développement, la synthèse d'antigènes caractéristiques de la feuille mûre. L'immuno-électrophorèse permet de constater l'existence de lignes de précipitation supplémentaires dans les préparations provenant de feuilles illuminées pendant 2 jours comparativement à d'autres obtenues à partir de feuilles conservées à l'abri de la lumière. Les antigènes organo-spécifiques apparaissent au cours du développement au moment où la feuille acquiert la structure morphologique caractéristique de la maturité. A côté de ces antigènes on a pu mettre en évidence dans les cellules foliaires trois autres antigènes qui se trouvent aussi dans les cellules des formations constituant l'embryon. Elles représentent l'élément commun déterminant les réactions immuno-chimiques entrecroisées entre les feuilles et l'embryon.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorèse des protéines de la gemmule des graines non germées et des feuilles, à divers stades du développement. *A* — Gemmule des graines non germées ; *B* — feuille, 4 jours après le début de la germination ; *C* — après 11 jours ; *D* — après 23 jours ; *E* — après 38 jours.

Fig. 2. — Immuno-électrophorèse des protéines du reste de l'embryon. *G* — Gemmule ; *R* — radicule + tigelle. *1* — immun-sérum anti-reste embryon ; *2* — immun-sérum anti-feuille.

Fig. 3. — Electrophorégramme et immuno-électrophorégrammes des protéines des feuilles de fève gardées à l'obscurité ou à la lumière. *1* = 8 jours à l'obscurité + 2 jours à la lumière ; *2* = 10 jours à l'obscurité ; *3* = 14 jours à l'obscurité + 2 jours à la lumière ; *4* — 16 jours à l'obscurité.

On a indiqué par des flèches les lignes de précipitation qui apparaissent en plus. Les lignes de précipitation réunies par des pointillés ont été trouvées semblables par les méthodes d'identification.

Fig. 4. — Immuno-électrophorégrammes des protéines des feuilles de fève à divers stades de développement. *1* = Feuille mûre ; *2* — gemmule de la graine non germée ; *3* = feuille, 4 jours après le début de la germination ; *4* = après 11 jours ; *5* = après 18 jours ; *6* = après 23 jours.

BIBLIOGRAFIE

1. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Cercetări imunochimice asupra germinației la bob* (Vicia faba). Studii și cercetări de biochimie, V, *4*, 541 (1962).
2. V. GHEȚIE, *Mărirea capacității de rezoluție electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat.* Studii și cercetări de biochimie, IV, *3*, 397 (1961).
3. E. R. GOLD, *Imunologie practică.* Ed. medicală, București, 1957, 145.
4. O. OUCHTERLONY, *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reaction in correlated systems of diffusion.* Acta Path. Scand., **32**, 231 (1953).
5. J. J. SCHEIDEGGER, *Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.* Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955)
6. V. GHEȚIE, D. MOTET-GRIGORAȘ, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză.* Studii și cercetări de biochimie, V, *3*, 409 (1962).
7. A. J. CROWLE, *Immunodiffusion.* Acad. Press., New-York and London, 1961.
8. J. HEREMANS, *Les globulines sériques du système gamma. Leur nature et leur pathologie.* Ed. Arscia, Bruxelles, 1961, 38—42.
9. R. ROHRINGER, M. STAHMANN, *Immunochemical studies with tomato leaf proteins.* Science, v. **127**, 1336, (1959).
10. R. HEITEFUSS, J. BUCHANAN-DAVIDSON, M. A. STAHMANN, *The stabilization of extract of cabbage leaf proteins by polyhydroxy compounds for electrophoretic and immunological studies.* Arch. Biochem. Biophys., **85**, 200 (1959).

11. V. GHEȚIE, *Cercetări asupra proteinelor din fasole* (Phaseolus vulgaris). *II. Modificarea proteinelor din sămînță în timpul germinației.* Studii și cercetări de biochimie, **II**, 3, 293 (1959).
12. J. BONNER, *Plant biochemistry.* Acad. Press. Inc., New York, 1950, 263–266.
13. O. MORITZ, *Die Serologie der pflanzlichen Eiweisskörper*, în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, **VIII**, 390.
14. M. RAYNAUD, *Remarque sur la réaction proteine-antiproteine.* Exp. Ann. biochim. med., **22**, 69 (1960).
15. Б. В. КОНЮХОВ, *Изменение антигенных свойств тканей животных в онтогенезе.* Усп. сов. биол. **45**, *1*, 97 (1958).

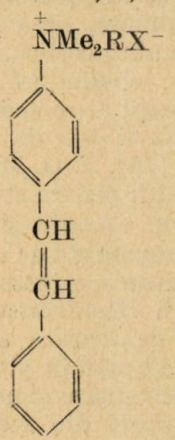
ACȚIUNEA ANTIACETILCOLINICĂ ȘI ANTICOLINESTERAZICĂ A UNOR SĂRURI CUATERNARE DE AMONIU DERIVATE DE LA STILBEN

DE

H. D. SCHELL

Studiind comportarea proteinelor serice și musculare față de unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben, cu grade diferite de lipofilie și descrise într-o lucrare anterioară [17], am constatat că în timp ce produșii de tipul I formează complecși fluorescenți cu anumite fracțiuni ale proteinelor serice și musculare, cele de tipul II nu reacționează cu acestea și nu formează complecși [19] [20].

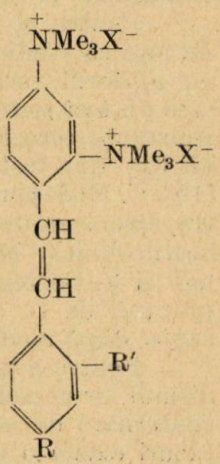
Pentru a vedea cum se comportă și alte substanțe curarizante față de proteinele amintite, am trecut și la studiul unor săruri cuaternare de amoniu cu alte structuri chimice, și anume al d-tubocurarinei, decametoniului, succinilcolinei, iodurii de trimetilamoniu și diclorurii de 4,4′-bis-(trimetilamoniu)-3,3′-dimetoxi-difenil.



I

$R = CH_3, C_2H_5, C_4H_9, C_8H_{17}, C_{16}H_{33}$

$X^- = I^-, Cl^-$



II

$R = H, CH_3, OCH_3$;
$R' = H$

$R = H$; $R' = OCH_3$

$X^- = I^-, Cl^-$

Rezultatele obținute au arătat că în timp ce d-tubocurarina se comportă ca și derivații stilbenici de tipul I, ceilalți produși nu dau complecși cu proteinele respective, comportîndu-se deci ca derivații stilbenici de tipul II. Dacă se analizează structura chimică a acestor compuși cercetați, se observă că toți posedă, ca o caracteristică comună, una sau două grupări de amoniu cuaternar, dar că produșii care dau complecși cu proteinele au un grad de lipofilie mai pronunțat decît ceilalți, care nu dau acești complecși. Înseamnă deci că pentru a forma complecși cu proteinele nu este suficient ca produsul să posede una sau mai multe grupări cuaternare de amoniu (grupări polare), ci trebuie să posede pe lîngă aceasta și un anumit grad de lipofilie, partea lipofilă (apolară) a moleculei putînd influența mai mult sau mai puțin favorabil formarea complexului, de pildă prin factori sterici, forțe van der Waals, punți de hidrogen.

Această comportare diferită a sărurilor cuaternare de amoniu față de proteine este interesantă și din alt punct de vedere, și anume dacă ținem seama de faptul că cele două grupe de produși aparțin totodată și la două clase diferite de substanțe curarizante. În timp ce d-tubocurarina, care dă complexul cu proteinele, aparține grupului pahicurarelor, adică al agenților de blocare competitivă a transmisiei neuro-musculare prin împiedicarea depolarizării membranei postjuncționale, sărurile cuaternare ca succinilcolina, decametoniul, iodura de trimetiloctilamoniu, care nu dau complexul, aparțin grupei leptocurarelor, adică a agenților depolarizanți care produc blocarea transmisiei neuromusculare prin producerea unei depolarizări persistente.

Pornind de la această constatare, am pus problema dacă nu cumva cele două tipuri de derivați stilbenici s-ar deosebi și ele prin mecanismul lor de acțiune, adică derivații de tipul I — care dau complecși cu proteinele — ca d-tubocurarina — și care posedă un grad mai mare de lipofilie — să aparțină clasei pahicurarelor, iar cei de tipul II și derivatul de la o-dianisidină — care nu dau complexul, comportîndu-se deci ca și succinilcolina și decametoniul — să aparțină leptocurarelor.

Pentru a verifica această presupunere, ne-am propus în lucrarea de față să studiem comparativ acțiunea antiacetilcolinică a acestor săruri, cu ajutorul testului mușchiului drept abdominal de broască. Acesta este un test sensibil, care poate da indicații asupra felului cum acționează substanța cercetată, adică dacă acțiunea ei este de tip curara sau de un alt tip. El a fost folosit de J. Raventos [16], J. O. Hoppe [9], C. Iordache [10], C. Medeșan și M. Stoica [12] și de alții pentru studierea relațiilor dintre structura unor săruri cuaternare de amoniu și activitatea lor antiacetilcolinică. Metoda aceasta este recomandată de asemenea de J. Cheymol și E. Corteggiani [7] pentru cercetarea substanțelor curarizante și propusă de D. Bovet [5] chiar pentru clasificarea substanțelor curarizante după modul lor de acțiune în pahicurare și leptocurare.

Pentru a primi eventual și unele indicații în plus privitoare la mecanismul lor de acțiune, am cercetat în continuare și acțiunea acestor săruri cuaternare de amoniu asupra colinesterazei din ser, știind că în unele cazuri există o anumită legătură între efectul curarizant și inhibiția co-

linesterazei [8], [13]. Acțiunea anticolinesterazică a sărurilor cuaternare de amoniu a fost cercetată și de F. Bergmann și A. Shimoni [3], F. Bergmann I. B. Wilson și D. Nachmansohn [4], N. Moldoveanu [14] ș. a.

Faptul că partea lipofilă din molecula sărurilor cuaternare de amoniu ar putea juca și ea — pe lîngă grupările polare din moleculă — un anumit rol în producerea efectului curarizant al acestor produși a fost arătat în ultima vreme de acad. E. Macovschi [11] și de alți autori [6], [15], [18].

MATERIAL ȘI METODE

În lucrarea de față am studiat acțiunea antiacetilcolinică și anticolinesterazică a sărurilor cuaternare de amoniu de tipul I derivate de la stilben: clorura de 4-trimetilamoniu-stilben (I), clorura de 4-dimetil-etil-amoniu-stilben (II), clorura de 4-dimetil-butil-amoniu-stilben (III), clorura de 4-dimetil-octil-amoniu-stilben (IV), clorura de 4-dimetil-cetil-amoniu-stilben (V), precum și a derivaților stilbenici de tipul II: diclorura de 2,4-bis-(trimetilamoniu)-stilben (VI), diclorura de 2,4-bis (trimetilamoniu)-4′-metoxi-stilben (VII), diclorura de 2,4-bis-(trimetilamoniu) -2′-metoxi-stilben (VIII), diclorura de 2,4-bis-(trimetilamoniu)-4′-metil-stilben (IX), ca și a diclorurii de 4,4′-bis-(trimetilamoniu)-3,3′-dimetoxi-difenil (X) — un produs nou, obținut de noi prin cuaternizarea o-dianisidinei, încă nepublicat și care de asemenea prezintă o fluorescență albastră în lumina ultravioletă. În sfîrșit am studiat acțiunea antiacetilcolinică și anticolinesterazică și la unele săruri cuaternare de amoniu cunoscute de mult în literatură, cum sînt: d-tubocurarina (XI), decametoniul (XII), succinilcolina (XIII) și iodura de trimetil-octil-amoniu (XIV), cu scopul de a avea termeni de comparație.

Pentru determinarea acțiunii antiacetilcolinice a acestor săruri cuaternare de amoniu am folosit testul mușchiului drept abdominal de broască. Experiențele au fost efectuate pe broaște capturate în perioada iulie—septembrie 1962, procedîndu-se în felul următor: mușchiul drept abdominal este izolat și suspendat într-o băiță cu soluție Ringer, la temperatura camerei (capacitatea băiței egală cu 5 ml). Printr-un curent continuu de aer, ce barbotează prin soluția Ringer, se asigură oxigenarea mușchiului. Stabilirea contracției etalon a mușchiului se face prin adăugarea în băiță a unei cantități de acetilcolină suficientă pentru a se obține o contracție de o amplitudine convenabilă. În cazul de față am lucrat cu o concentrație de 2μg/ml acetilcolină, lăsate 3 min în contact cu mușchiul. Amplitudinea contracției este înregistrată cu ajutorul unui kimograf. Apoi se spală mușchiul cu soluție Ringer pînă cînd el revine la tonusul inițial și se introduce în băiță o cantitate de 1,6 (sau 1,2) μg de d-tubocurarină dizolvată în soluție Ringer. Se lasă mușchiul în contact cu d-tubocurarina timp de 5 min, apoi se introduce în băiță o cantitate de acetilcolină egală cu aceea stabilită la începutul experienței pentru etalonare și se înregistrează răspunsul mușchiului. Se spală mușchiul din nou cu soluție Ringer și

după revenirea lui la contracția acetilcolinică etalon, se introduce substanța de cercetat dizolvată în soluție Ringer, procedîndu-se mai departe ca și în cazul d-tubocurarinei. Cantitățile de substanță adăugate au fost astfel alese ca să producă o inhibiție a contracției acetilcolinice pe cît se poate de apropiată cu cea produsă de d-tubocurarină, considerînd că la o inhibare egală a contracției acetilcolinice corespunde și o activitate egală [7].

Pentru a urmări acțiunea sărurilor cuaternare de amoniu de mai sus asupra colinesterazei s-a folosit metoda manometrică la aparatul Warburg, ținînd seama de tehnica dată de R. Ammon [1], R. Ammon și G. Voss [2] și lucrînd în aceleași condiții ca și N. Moldovanu [14]. Ca sursă de enzimă (colinesterază) s-a folosit serul sangvin nehemolizat de om, diluat 1 :10 cu soluție $Ringer_{30}$ iar ca sursă de substrat — clorura de acetilcolină dizolvată în soluție $Ringer_{30}$ (5 000 μg acetilcolină într-un ml de soluție $Ringer_{30}$). Sărurile cuaternare de amoniu au fost folosite ca soluții în tampon de fosfați M/15, cu pH 7,4, în concentrații care au variat între 5 și 5 000 μg/ml. În partea centrală a vasului Warburg se introducea 1 ml ser sangvin diluat și 1 ml din soluția sării cuaternare de amoniu de cercetat. După ce sarea cuaternară acționa timp de 60 min asupra serului sangvin la 37°C, se adăuga la acest amestec 1 ml soluție de acetilcolină, introdusă încă de la început în tubul lateral al vasului de reacție și din 10 în 10 min se citeau valorile indicate de manometru. În lucrarea de față sînt date valorile indicate după 30 min.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

După cum rezultă din datele experimentale cuprinse în tabela 1, sărurile cuaternare de amoniu cercetate pot fi împărțite în trei grupe: o primă grupă (I—V) este formată de derivații stilbenici de tipul I, care au o acțiune net antagonistă față de acetilcolină pe mușchi drept abdominal de broască. Aceste săruri aparțin deci, după clasificarea substanțelor curarizante dată de D. Bovet [5], grupei pahicurarelor, adică a substanțelor curarizante de tipul curarei. Ordinul de mărime al efectului antiacetilcolinic se apropie de cel al d-tubocurarinei, fiind însă de 2,5—5 ori mai slab.

Derivații stilbenici de tipul II formează o a doua grupă (VI—IX) care, la o concentrație la care derivații stilbenici de tipul I produc o inhibiție de 93—95% a contracției acetilcolinice, sînt încă complet lipsiți de vreo acțiune și nu antagonizează acetilcolina pe mușchiul drept abdominal de broască decît abia la o concentrație de 100—175 de ori mai mare. Acțiunea lor antiacetilcolinică este de aproximativ 600 ori mai slabă decît cea a d-tubocurarinei. În sfîrșit, produșii din grupa a treia (X, XII—XIV) care produc ei înșiși o contracție a mușchiului drept abdominal de broască, similară aceleia datorite acetilcolinei, fără ca să mai fie nevoie de adăugarea acesteia; ei aparțin deci după clasificarea lui D. Bovet, grupei leptocurarelor.

Tabela 1

Acțiunea antiacetilcolinică pe mușchi drept abdominal de broască a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben în comparație cu d-tubocurarina

Substanța cercetată	Ach etalon µg/ml	Concentrația µg/ml	Diferența % între înălțimea răspunsului mușchiului la Ach înainte și după tratare cu :		Activitatea subst. față de d-Tc.
			d-Tc	substanță	
d-Tc I	2	1,6 8	−94	−93	5 ori mai slabă
d-Tc II	2	1,6 6	−94	−96	3,7 ”
d-Tc III	2	1,6 4	−94	−89	2,5 ”
d-Tc IV	2	1,6 6	−94	−95	3,7 ”
d-Tc V	2	1,6 6	−94	−94	3,7 ”
d-Tc VI	2	1,2 700	−89	−84	circa 600 ori mai slabă
d-Tc VII	2	1,2 700	−89	−85	” ”
d-Tc VIII	2	1,2 700	−89	−84	” ”
d-Tc IX	2	1,2 700	−89	−87	” ”
d-Tc X	2	1,6 20	−94	+94	
d-Tc XII	2	1,6 20	−94	+111	
d-Tc XIII	2	1,6 20	−94	+150	
d-Tc XIV	2	1,6 20	−94	+36	

Se constată deci o diferență netă între comportarea produșilor de tipul I pe de o parte și a produșilor de tipul II și a derivatului de la odianisidină pe de altă parte, față de acetilcolină, pe mușchi drept abdominal de broască. Astfel, presupunerea noastră s-a arătat a fi justă, în sensul că produșii stilbenici de tipul I fac într-adevăr parte din grupa sărurilor cuaternare de amoniu de tipul curarei (pahicurarelor) și că, chiar dacă produșii de tipul II nu produc o contracție similară aceleia provocate de acetilcolină, așa cum se întîmplă cu derivatul de la o-dianisidină care s-a dovedit prin aceasta că aparține grupei leptocurarelor, totuși prin faptul că sînt inactivi pînă la o concentrație atît de mare, ei se îndepărtează de grupa pahicurarelor.

La studierea activității antiacetilcolinice a derivaților stilbenici de tipul I s-a putut constata totodată o anumită variație a acestei acti-

vităţi în funcţie de lungimea radicalului R de la atomul de azot cuaternar (fig. 1). Inhibiţia contracţiei acetilcolinice este maximă la sărurile cuaternare unde acest radical este format din 2 şi 4 atomi de carbon, descrescînd apoi uşor spre produşii cu radicalul format din 8 şi 16 atomi de carbon, fără însă a atinge valoarea produsului din capul seriei, unde radicalul R este format dintr-un singur atom de carbon. Variaţia radicalului R fiind singura modificare ce se produce în molecula produsului, restul moleculei rămînînd neschimbat, înseamnă că acţiunea antiacetilcolinică depinde într-o oarecare măsură de lungimea radicalului atomului de azot cuaternar, adică de caracterul lipofil mai mult sau mai puţin pronunţat al produsului.

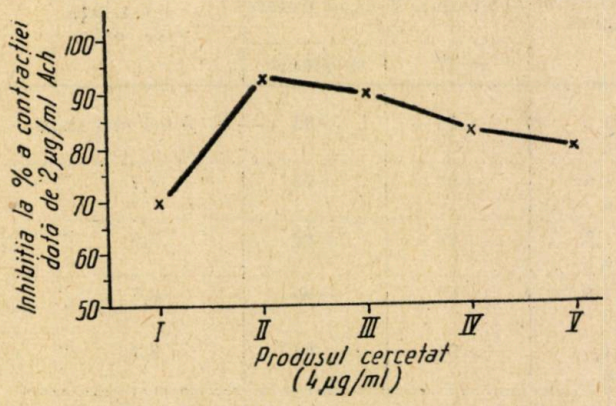


Fig. 1. — Variaţia acţiunii antiacetilcolinice pe muşchi drept abdominal de broască a sărurilor cuaternare de amoniu derivate de la stilben de tipul I, în funcţie de radicalul R de la atomul de azot cuaternar.

Trecînd la analiza datelor experimentale obţinute la cercetarea acţiunii sărurilor cuaternare de mai sus asupra colinesterazei din ser, se constată că toţi produşii studiaţi posedă proprietăţi anticolinesterazice (tabela 2).

Derivaţii stilbenici de tipul I inhibă activitatea colinesterazei într-o măsură considerabilă deja la o concentraţie de 10 µg în cei 3 ml soluţie din vasul de reacţie. La o concentraţie de 250 µg, activitatea colinesterazică este practic complet inhibată de către toţi produşii de tipul I; la această concentraţie, produşii de tipul II nu exercită nici o influenţă asupra activităţii colinesterazice din ser. Activitatea acestei enzime începe să fie înhibată abia la o concentraţie de 1 500—2 000 µg de substanţă în cei 3 ml din vasul de reacţie. Mărind concentraţia substanţelor chiar pînă la 5 000 µg, nu se obţine decît o inhibiţie parţială, cuprinsă între 39—69%. În această categorie de compuşi se încadrează şi derivatul de la o-dianisidină, care şi în comportarea sa faţă de proteinele serice şi musculare se comportă ca aceştia.

La celelalte săruri cuaternare de amoniu care au mai fost cercetate (d-tubocurarina, decametoniul, succinilcolina, iodura de trimetiloctilamoniu) nu s-a mai putut constata în acest caz o comportare diferită a produşilor din grupa pahicurarelor faţă de cei din grupa leptocurarelor, toţi prezentînd o activitate colinesterazică mai mult sau mai puţin pronunţată.

Dacă se compară activitatea anticolinesterazică a derivaţilor de la stilben şi de la o-dianisidină determinată la aparatul Warburg cu

Tabela 2

Acțiunea anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben, exprimată în procente față de activitatea colinesterazei din serul martor

0 = lipsită de efect asupra activității colinesterazei
100 = inhibiție totală a activității colinesterazei

Substanța cercetată	Cantitatea substanței din cei 3 ml de soluție din vasul de reacție, exprimată în μg											
	5	10	50	100	250	500	1 000	1 500	2 000	3 000	4 000	5 000
I	0	31	78	90	100	100	—	—	—	—	—	—
II	0	30	84	88	98	100	—	—	—	—	—	—
III	0	18	80	95	98	100	—	—	—	—	—	—
IV	0	19	85	92	100	100	—	—	—	—	—	—
V	8	38	89	93	100	100	—	—	—	—	—	—
VI	—	—	—	—	—	—	—	19	37	61	63	69
VII	—	—	—	—	—	—	—	—	30	45	48	50
VIII	—	—	—	—	—	—	—	—	14	18	31	39
IX	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32	39
X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	57	60
XI	0	14	31	35	40	52	68	74	77	—	—	—
XII	0	31	68	70	75	100	—	—	—	—	—	—
XIII	—	—	—	—	0	9	43	62	94	—	—	—
XIV	—	—	—	0	3	43	69	86	100	—	—	—

acțiunea lor antiacetilcolinică asupra mușchiului drept abdominal de broască, se constată existența unui anumit paralelism între aceste două activități. Derivații de tipul I, care au o puternică acțiune antiacetilcolinică asupra mușchiului drept abdominal de broască, exercită de asemenea și o acțiune inhibitoare remarcabilă asupra activității colinesterazei din ser; în același timp, derivații de la stilben de tipul II și al o-dianisidinei posedă un efect antiacetilcolinic doar la concentrații extrem de mari și exercită asupra colinesterazei o acțiune relativ slabă, și aceasta numai la concentrații de asemenea foare mari.

CONCLUZII

Din rezultatele experimentale obținute în cazul sărurilor cuaternare de amoniu studiate de noi, se poate vedea că părții lipofile (apolare) a moleculei îi revine un rol important în imprimarea proprietăților fizico-chimice și farmacodinamice ale acestor produși, putînd influența nu numai intensitatea activității, dar chiar și mecanismul lor intim de acțiune.

Prezentată la redacție la 2 noiembrie 1962

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

ПРОТИВОАЦЕТИЛХОЛИНОВОЕ И ПРОТИВОХОЛИНЭСТЕРАЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ СОЛЕЙ АММОНИЯ, ПРОИЗВОДНЫХ СТИЛЬБЕНА

РЕЗЮМЕ

В предыдущих работах, касающихся взаимодействия сывороточных и мышечных белков с некоторыми флуоресцентными четвертичными солями аммония, производными стильбена, автор констатировал различное поведение этих соединений в том смысле, что производные стильбена типа I, обладающие более выраженным липофильным характером, дают с белками флуоресцентные комплексные соединения, тогда как производные типа II, менее липофильные не дают подобных комплексных соединений. При исследовании взаимодействия белков с другими кураризирующими веществами удалось заметить, что соединения группы пахикураре также дают комплексные соединения с белками, тогда как производные группы лептокураре не дают таковых.

С целью выяснения не различаются ли указанные два типа производных стильбена также и по механизму их действия, в том смысле, что соединения типа I относятся к пахи-, а соединения типа II — к лептокураре, в настоящей работе исследовалось их противоацетилхолиновое действие на прямой мышце живота лягушки, что по указанию Д. Бовета рекомендуется для классификации кураризирующих веществ по их поведению. Было констатировано, что производные стильбена типа I действительно принадлежат к пахикураре, а производные типа II не вызывают сжимания мышцы подобно ацетилхолину; все же, принимая во внимание то, что они остаются неактивными до больших концентраций, можно считать, что они отличаются от пахикураре. В то же время для производных стильбена типа I было констатировано некоторое изменение противоацетилхолинового действия, в зависимости от длины радикала R атома четвертичного азота; это действие максимально для производных, где число атомов углерода в радикале равняется двум и четырем.

Автор также исследовал действие этих солей на холинэстеразу сыворотки и констатировал наличие некоторого параллелизма между противоацетилхолиновым и противохолинэстеразным действиями.

Полученные данные показывают, что липофильная часть молекулы играет важную роль в физико-химических и фармакодинамических свойствах изученных четвертичных солей аммония; эта часть молекулы может влиять не только на интенсивность действия, но даже и на его интимный механизм.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение противоацетилхолинового действия на прямую мышцу живота лягушки четвертичных солей аммония, производных стильбена типа I, в зависимости от радикала R четвертичного атома азота.

ACTION ANTIACÉTYLCHOLINIQUE ET ANTICHOLINESTÉRASIQUE DE QUELQUES SELS QUATERNAIRES D'AMMONIUM DÉRIVÉS DU STILBÈNE

RÉSUMÉ

Dans de précédents travaux sur l'interaction entre les protéines sériques et musculaires et certains sels quaternaires d'ammonium fluorescents dérivés du stilbène, l'auteur a constaté deux manières d'agir de ces substances : celles du type I, comprenant des dérivés stilbéniques à lipophilie prononcée, donnent avec les protéines des complexes fluorescents, tandis que celles du type II, moins lipophiles, ne produisent pas de tels complexes. Une extension des recherches à d'autres substances curarisantes a permis d'observer que les produits du groupe des pachycurares donnent eux aussi des complexes, alors que ceux du groupe des leptocurares ne présentent pas cette propriété.

Pour vérifier si les deux types de derivés stilbéniques diffèrent aussi par leur mécanisme d'action, c'est-à-dire si ceux du 1er groupe appartient aux pachycurares et ceux du 2e aux leptocurares, on a étudié dans le présent travail leur action antiacétylcholinique sur le muscle droit abdominal de la grenouille, test indiqué par D. Bovet pour la classification des substances curarisantes d'après leur mode d'action.

On a pu constater de cette manière que les dérivés stilbéniques du type I appartiennent en effet aux pachycurares et que ceux du type II, même s'ils ne provoquent pas une contraction similaire à l'acétylcholine, s'écartent pourtant du groupe des pachycurares par le fait qu'ils restent inactifs jusqu'à une grande concentration. Chez les dérivés stilbéniques du premier type on a pu observer en même temps une certaine variation de l'activité antiacétylcholinique en fonction de la longueur du radical R attaché à l'atome d'azote quaternaire ; cette activité atteint un maximum quand R contient 2 et 4 atomes de carbone.

En étudiant ensuite l'action de ces sels sur la cholinestérase du sérum on a constaté l'existence d'un certain parallélisme entre l'action antiacétylcholinique et l'action anticholinestérasique.

Les résultats obtenus montrent que la partie lipophile de la molécule joue un rôle important dans la formation des propriétés physico-chimiques et pharmacodynamiques des sels quaternaires étudiés, en influençant non seulement l'intensité de leur activité, mais aussi le mécanisme intime de leur action.

EXPLICATIONS DES FIGURES

Fig. 1. — Variation de l'action antiacétylcholinique exercée sur le muscle droit abdominal de la grenouille par des sels quaternaires d'ammonium dérivés du stilbène (type I), en fonction de la longueur du radical R attaché à l'atome d'azote quaternaire.

BIBLIOGRAFÎE

1. AMMON R., *Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.* Pflügers Arch., **233**, 486—491 (1933).
2. AMMON R., VOSS G., *Die acetylcholinzerstörende Wirkung des Blutes.* Pflügers Arch., **235**, 393—400 (1935).
3. BERGMANN F., SHIMONI A., *Quaternary ammonium salts as inhibitors of acetylcholinesterase.* Chem. Abstr., **46**, 10 240 f (1952).
4. BERGMANN F., WILSON, I. B., NACHMANSOHN D., *The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relation to the active groups of cholinesterase. Action of stilbamidine upon the nerve impulse conduction.* Chem. Abstr., **45**, 4 360 a (1951).
5. BOVET D., *Some aspects of the relationship between chemical constitution and curare-like activity.* Ann. N.Y. Acad. Sci., **54**, 407—437 (1951).
6. CAVALLITO C. J., *Influences of lipophilic structures on curarimimetic and other activities of some quaternary ammonium salts.* Atti XI Congresso Società Italiana di Anestesiologia, Simposio Internazionale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti. Venezia 12—15 settembre, 1958, 149—161.
7. CHEYMOL J., CORTEGGIANI E., *Étude critique des méthodes de standardisation des curares naturels et de synthèse.* III. Ann. pharm. franc., **7**, 368—395 (1949).
8. CHEYMOL J., CORTEGGIANI E., *Dissociation des effets anticholinestérasiques et des actions sensibilisantes sur l'acétylcholine produits par quelques curares de synthèse.* Journ. de Physiol., **45**, 511 (1953).
9. HOPPE J. O., *A new series of synthetic curare-like compounds.* Ann. N. Y. Acad. Sci.,**54**, 395—406 (1951).
10. IORDACHE C., *Acțiunea unor săruri cuaternare de amoniu asupra comportării mușchiului drept abdominal de broască față de acetilcolină.* Comunicările Acad. R.P.R., **5**, 1181—1186 (1955).
11. MACOVSKI E., *Dans le domaine des substances curarisantes.* Atti XI Congresso Società Italiana di Anestesiologia, Simposio Internazionale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti, Venezia 12—15 settembre, 1958, 121—130.
12. MEDEȘAN C., STOICA M., *Acțiunea unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la 2,7-diaminofluoren asupra organismului animal.* Studii și cercet. biochim., **3**, 417—428 (1960).
13. MERLEN J. E., AUBRY G., *Action de certain curarisants de synthèse sur la cholinesterase sérique de l'homme.* C.R. Soc. Biol., **144**, 701 (1950).
14. MOLDOVEANU N., *Acțiunea anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu.* Comunicările Acad. R.P.R., **7**, 39—43 (1957).
15. NADOR K., *Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und pharmakodynamischer Wirkung bei Verbindungen mit lähmenden Effekt der neuro-muskulären Transmission.* Atti XI, Congresso Società Italiana di Anestesiologia, Simposio Internazionale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti. Venezia 12—15 settembre 1958, 322—333.
16. RAVENTOS J., *Synergismus und Antagonismus von Acetylcholin und quaternären Ammoniumverbindungen.* C. I, 4 821 (1937).
17. SCHELL H. D., *Săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben.* Studii și cercet. chimie, **4**, 681—692 (1961).
18. SCHELL H. D., *Comportarea proteinelor sangvine și musculare față de unele substanțe curarizante fluorescente derivate de la stilben.* Studii și cercet. biochimie, **4**, 365—369 (1961).
19. SCHELL H. D., *Interacțiunea unor substanțe curarizante fluorescente cu proteinele serice.* Studii și cercet. biochimie, **4**, 505—515 (1961).
20. SCHELL H. D., *Interacțiunea unor săruri cuaternare de amoniu fluorescente cu proteinele musculare* (sub tipar).

ENZIME PECTOLITICE DIN *ASPERGILLUS NIGER*

I. PRODUCEREA POLIGALACTURONAZELOR ÎN MEDII DE CULTURĂ SINTETICE

DE

S. VASU

Aspergillus niger, la fel ca multe alte mucegaiuri, bacterii sau drojdii, produce enzime pectolitice care, acționînd asupra substanțelor pectice cauzează schimbări profunde în structura și propietățile acestora.

Două grupe de enzime pectolitice sînt mai bine cunoscute: pectinesterazele care hidrolizează grupările metoxil, conducînd la acizi pectici, și poligalacturonazele care, acționînd asupra legăturilor glicosidice din moleculele substanțelor pectice, afectează gradul lor de polimerizare.

Folosirea unor denumiri diferite pentru aceste enzime, precum și utilizarea unor substrate nu întodeauna bine precizate și caracterizate a dus la confuzii în cercetarea lor. În ultimii ani, A. L. Demain și H. J. Phaff [1] au adus o serie de precizări privind nomenclatura poligalacturonazelor, precizări care încep să fie adopatate și de alți autori [2] [3], [4]. După acestea, distingem polimetilgalacturonaze (PMG) care acționează cu preferință asupra acizilor pectinici și poligalacturonaze (PG) care atacă preferențial acizii pectici. Dacă enzimele menționate produc depolimerizarea substratelor micșorînd repede viscozitatea lor, se adaugă prefixul „endo", iar dacă conduc la eliberarea treptată de acizi mono-, bigalacturonici, mărind puterea reducătoare a mediului de reacție, se folosește prefixul „exo".

Obținerea unui amestec de diferite poligalacturonaze în culturile unor microorganisme este semnalată în literatură. Astfel, A. Ayres și colaboratori [5] presupun că poligalacturonazele din *Aspergillus foetidus* sînt un complex de cel puțin trei enzime pectolitice. E. Schubert [6] indică prezența a patru enzime pectolitice în mediul de cultură în care s-a dezvoltat *Aspergillus niger*. Cu toate acestea, H. J. Phaff și A. L. Demain [7] au demonstrat natura unienzimatică a poligalacturonazei produse de *Sacchromyces fragilis*.

Pe de altă parte, folosindu-se diferite microorganisme, s-a arătat că poligalacturonazele pot fi enzime constitutive sau adaptive [8], [9], [10], [11], [12], [13]. În acest sens și *Aspergillus niger* poate forma două tipuri de poligalacturonaze, una constitutivă și alta adaptivă [14], [15],[16].

Este bine cunoscut de asemenea faptul că enzimele pectolitice și-au găsit o largă aplicare practică în diferite sectoare ale industriei alimentare și ușoare [17]; aceasta a dus la producerea industrială a lor, folosindu-se în acest scop diferite specii de *Aspergillus* sau *Penicillium* [17]. Foarte adesea însă literatura dă puține informații referitoare la metodele de cultură folosite și la prelucrarea ulterioară a culturilor obținute. În general se utilizează medii naturale de cultură, solide, de exemplu tărîțe de grîu [17], [18], [19], iar preparatele obținute prin uscarea miceliului împreună cu mediul de cultură sînt folosite ca atare sau sînt supuse extracțiilor și precipitărilor, pentru separarea enzimelor pectolitice.

Luînd în considerare cele de mai sus, ne-am propus să cercetăm producerea diferitelor poligalacturonaze în culturile de *Aspergillus niger*, folosind în primul rînd medii de cultură sintetice, în scopul obținerii de preparate pectolitice în condiții reproductibile, să purificăm preparatele obținute și să separăm diferitele tipuri de poligalacturonaze, în vederea stabilirii propietăților lor și a acțiunii pe care ele o exercită asupra substanțelor pectice.

Prezenta lucrare se referă la stabilirea condițiilor de cultivare a mucegaiului *Aspergillus niger* și la producerea poligalacturonazelor în prezența diferitelor surse de azot și carbon, atribuind un loc special, în acest sens, substanțelor pectice.

Deoarece vom urmări activitatea enzimelor pectolitice pe extracte sau lichide brute, fără purificarea și separarea diferitelor tipuri de poligalacturonaze, nu vom folosi denumirile propuse de A. L. Demain și H. J. Phaff [1]. Pentru ușurința expunerii și urmăririi rezultatelor vom utiliza următoarele notații : pentru activitatea poligalacturonazelor urmărită prin scăderea viscozității acizilor pectinici PMG_1 și a acizilor pectici PG_1, iar pentru activitatea determinată prin creșterea puterii reducătoare a mediului de reacție în prezența acizilor pectinici PMG_2 și în prezența acizilor pectici PG_2.

MATERIAL ȘI METODE

S-a folosit *Aspergillus niger* nr. 34 din colecția Institutului de cercetări alimentare Băneasa-București, specie folosită pentru obținerea Aspergolului [18].

Sporii necesari însămînțărilor s-au obținut prin dezvoltarea mucegaiului timp de 14 zile pe felii de morcov sterile. Sporii erau suspendați în apă distilată sterilă, iar suspensia era filtrată, în condiții sterile, printr-un strat de vată suficient de gros pentru obținerea unei dispersări cît mai bune a lor ; erau apoi numărați în camera Tuerk și diluați cu apă distilată sterilă, obținînd final 10^6 spori/ml.

S-au folo sit mediile de cultură Raulin, Czapek și mediul bazal pentru nitrat și asimilarea zahărului, preparate după r ețetele date în tratatul lui A. Jörgensen [20]. Modificările compoziției chimice a mediilor vor fi indicate în cursu l lucrării.

S-au obținut culturi de suprafață în baloane Erlenmeyer de 100 ml ce conțineau cîte 50 ml mediu de cultură, sterilizat timp de 30 min la 0,5 atm. Mucegaiul era lăsat să se dezvolte în termostat la 30±1°C, timp de 3—12 zile.

Miceliul era separat de mediul de cultură filtrînd prin tifon, era spălat de mai multe ori cu apă distilată, aducînd filtratul la un volum final de 100 ml. Miceliul era apoi uscat cu hîrtie de filtru și se determina greutatea uscată la 105°C. Miceliul provenit de la altă probă era omogenizat cu apă rece în omogenizatorul Potter-Elveljen, era apoi diluat pentru a se obține un omogenat 10%, era lăsat circa 24 de ore la frigider pentru extragerea enzimelor și apoi era centrifugat timp de 5 min la 3 000 ture/min. pH-ul mediilor de cultură era determinat înainte de diluare cu ajutorul aparatului Multiplex V.

Pe supernatantul obținut prin centrifugarea omogenatului de miceliu 10% și pe mediul de cultură diluat final la 100 ml (lichid de cultură) se determina activitatea poligalacturonazelor, în cazul de față fără nici o prealabilă separare sau purificare a enzimelor.

Pentru prepararea substratelor și a mediilor de cultură s-au folosit : Apple Pectin 250 grade (BDH), purificată după indicațiile lui Z. I. Kertesz [17] și acid pectic preparat după R. P. Newbold și M. A. Joslyn [21]. Caracteristicile preparatelor obținute au fost, în medie : pentru acizii pectinici 82% acid galacturonic, 8,1% grupe metoxil, 9,8% umiditate și 0,97% cenușă, iar pentru acizii pectici 92% acid galacturonic, 9,6% umiditate și 0,52% cenușă.

Acizii pectici și pectinici erau umectați cu etanol și solubilizați în apă distilată, adăugînd picătură cu picătură NaOH 5% (sub continuă și puternică agitare) pînă la pH = 4,1 ; erau apoi diluați la o concentrație finală de 1% ; se adăuga în prealabil amestec tampon de acid citric (0,1 M) — fosfat disodic (0,2 M) pH = 4,1, în proporție de 30 ml pentru fiecare 100 ml de soluție de acizi pectici sau pectinici 1%. Soluțiile astfel obținute își menținеau viscozitatea inițială timp de mai multe zile, dacă erau păstrate la temperatura de 4—5°C, cu un adaos de cîteva picături de toluen.

Activitatea poligalacturonazelor era urmărită prin scăderea viscozității și prin creșterea puterii reducătoare, în următoarele condiții :

Pentru urmărirea scăderii viscozității, se pipetau în viscozimetre Ostwald cîte 9 ml soluție de acizi pectici sau pectinici 1%. Se lăsau la temperatura de 30°C timp de 15 min, apoi se adăuga 1 ml soluție ce conține enzima (lichid de cultură sau supernatant obținut prin centrifugarea omogenatului de miceliu). Se determina timpul necesar scăderii viscozității cu 50% socotind 100% viscozitatea probei martor (9 ml soluție de acizi pectici sau pectinici 1% și 1 ml soluție ce conține enzimă inactivată prin fierbere timp de 10 min). În aceste condiții, timpul necesar reducerii viscozității relative cu 50% era invers proporțional cu concentrația enzimei, respectiv direct proporțional cu numărul invers al acestui timp. Convențional, am socotit ca unitate de activitate enzimatică cantitatea de enzimă care, în condițiile de mai sus, reduce cu 50% viscozitatea acizilor pectici sau pectinici în timp de 10 min ; numărul invers al acestui timp fiind 0,1.

Creșterea puterii reducătoare a mediului de reacție s-a urmărit ținînd seama de indicațiile date de E. F. Jansen și L. R. McDonnell [22], precum și de Z. I. Kertesz [23]. Probele conțineau : 2,5 ml soluție de acizi pectici sau pectinici 1%, 2 ml apă distilată și 0,5 ml soluție ce conține enzimă (adăugată după ce s-a ajuns la temperatura de reacție, adică la 30°C). După 3 ore se adăugau 0,9 ml Na_2CO_3 1M și 5 ml soluție de iod 0,1 N. După 20 min se acidula cu 2 ml H_2SO_4 2 M, iar excesul de iod era titrat cu $Na_2S_2O_3$ 0,1 N. În aceleași condiții se făceau probe martor, adăugînd înaintea enzimei 0,9 ml Na_2CO_3 1 M. Rezultatele sînt exprimate în unități de activitate enzimatică, socotind ca unitate cantitatea de enzimă care, în condițiile de mai sus, eliberează 1 milimol de grupări reducătoare în timp de 1 min [22], [23].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru a stabili condiţiile de cultivare a mucegaiului *Aspergillus niger* care ar permite să se obţină probe comparabile, s-a urmărit în primul rînd numărul optim de spori care trebuie însămînţaţi. Probe de cîte 50 ml mediu Raulin erau însămînţate cu cîte 1.10^3—2.10^5 spori pentru 1 ml mediu de cultură. S-a determinat greutatea uscată a miceliului şi activitatea PG_1 a lichidului de cultură după 3—9 zile. Rezultatele obţinute după 4 zile sînt date în tabela 1.

Tabela 1 *)

Influenţa numărului de spori asupra producţiei de miceliu şi PG_1 din lichidul de cultură (rezultate obţinute după 4 zile de dezvoltare a mucegaiului)

Nr. de spori în 50 ml mediu	5.10^4	1.10^5	5.10^5	1.10^6	5.10^6	1.10^7
Greutatea uscată a miceliului, g	0,852	0,887	0,927	0,995	1,097	1,110
PG_1 unităţi enzim.	38,5	39,2	39,8	43,1	42,4	42,7

*) În toate tabelele se folosesc următoarele notaţii: pentru activitatea urmărită prin scăderea viscozităţii acizilor pectici PG_1 şi a acizilor pectinici PMG_1; pentru activitatea determinată prin creşterea puterii reducătoare a mediului de reacţie în prezenţa acizilor pectici PG_2 şi a acizilor pectinici PMG_2; unitatea PG_1 sau PMG_1 este cantitatea de enzimă care reduce viscozitatea acizilor pectici sau pectinici (soluţii 1%) cu 50% în timp de 10 min; unitatea PG_2 sau PMG_2 este cantitatea de enzimă care eliberează 1 milimol grupări reducătoare în timp de 1 min.

Din rezultatele obţinute a reieşit că probele trebuie însămînţate cu 2.10^4 spori pentru 1 ml mediu de cultură (respectiv cu 1.10^6 spori pentru 50 ml mediu de cultură).

Însămînţînd cu 1.10^6 spori probe de 50 ml mediu Raulin, s-a urmărit dezvoltarea microorganismului timp de 2—13 zile, determinînd greutatea uscată a miceliului, pH-ul mediului de cultură şi PG_1 din lichidul de cultură. Rezultatele sînt date în tabela 2.

Tabela 2

Variaţia producţiei de miceliu, a pH-ului şi a activităţii PG_1, a mediului de cultură, în funcţie de durata de dezvoltare a culturilor de *Aspergillus niger* pe mediul Raulin

Timpul în zile	2	3	4	6	8	9	13
Greutatea uscată a miceliului, g	0,142	0,534	0,925	1,063	0,820	0,763	0,653
pH-ul mediului	2,71	2,06	2,86	4,05	6,60	7,10	7,90
PG_1 unităţi enzimatice	0,64	10,6	39,9	250,0	136,0	83,3	17,3

Din tabela 2 rezultă că PG_1 creşte o dată cu desvoltarea miceliului, înregistrînd un maxim în ziua a şasea, pentru ca apoi să scadă brusc. Scăderea activităţii enzimei urmează scăderea greutăţii miceliului, provocată de începerea proceselor autolitice care cauzează totodată o creştere marcantă a pH-ului mediului de cultură (de la 4,05 la 7,90).

Aceste rezultate, precum și unele date din literatură referitoare la producerea amilazei în culturile de *Aspergillus oryzae* [24], [25], ne-au sugerat ideea de a urmări pe de o parte influența pH-ului asupra stabilității poligalacturonazelor, iar pe de altă parte influența pH-ului mediului de cultură asupra desvoltării miceliului și a producției de enzime pectolitice.

Influența pH-ului asupra stabilității poligalacturonazelor s-a urmărit astfel: probe de cîte 20 ml lichid de cultură, cu activitate enzimatică cunoscută, erau aduse la anumite pH-uri adăugînd HCl 0,1 N sau NaOH 0,1 N diluate final la 50 ml, apoi se adăugau cîteva picături de toluen și se păstrau la 30 $\pm$1°C timp de mai multe zile; din timp în timp se determina PG_1. Rezultatele sînt date în tabela 3.

Tabela 3

Stabilitatea PG_1 în funcție de pH, la 30$\pm$1°C (rezultate în unități enzimatice pentru 1 ml probă)

Timpul de păstrare zile	pH					
	2,03	2,75	3,05	3,52	4,70	8,10
0	1,54	1,54	1,56	1,54	1,54	1,32
2	1,56	1,58	1,56	1,58	1,48	0,11
5	1,56	1,56	1,52	1,56	1,46	0,08
8	1,55	1,58	1,55	1,56	1,40	0,08
13	1,56	1,57	1,56	1,55	1,39	0,07

Din rezultatele obținute reiese că pH-ul mediului de cultură nu trebuie să crească mult peste 3,52 și să fie în orice caz mai mic de 4,70, pentru ca enzima să nu-și piardă din activitatea sa. Menționăm că pH-ul de 4,1 al amestecului de acid pectic-enzimă din viscozimetrul Ostwald s-a menținut neschimbat în cazul tuturor probelor. Aceste rezultate pot explica și datele din tabela 2, care indică scăderea bruscă a activității PG_1 o dată cu creșterea pH-ului mediului de cultură.

Pentru urmărirea influenței pH-ului mediului de cultură asupra dezvoltării miceliului și a producției de enzimă, mediului Raulin i s-au adăugat 18 g KH_2PO_4 și 22 g $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ pentru 1000 ml mediu; pH-ul dorit era realizat prin acidulare cu HCl 5 N sau alcalinizare cu NaOH 20%. Probe de cîte 50 ml mediu Raulin, tamponate la diferite pH-uri, erau însămînțate cu același număr de spori, iar la diferite intervale de timp se determina greutatea uscată a miceliului, pH-ul mediului și activitatea PG_1 a lichidului de cultură, precum și a omogenatului de miceliu. Menționăm că în probele care înainte de sterilizare aveau pH-ul = 1, *Aspergillus niger* nu s-a dezvoltat. Rezultatele obținute sînt redate în tabelele 4 și 5, iar tabela 6 cuprinde activitatea PG_1 din miceliu și lichidul de cultură, exprimată procentual față de activitatea totală a probei respective.

Datele din tabelele 4 și 5 arată că *Aspergillus niger* se dezvoltă cel mai bine pe mediul tamponat la pH-ul 2—5, însă PG_1 se produce în cantitate mai mare la pH 2—3. După cum reiese din tabela 6, pH-ul mediului de cultură influențează și raportul dintre PG_1 intra- și extra-

Tabela 4

Activitatea PG_1 din lichidul de cultură și pH-ul mediului Raulin tamponat (numărul probei corespunde cu pH-ul inițial al mediului)

Timpul în zile	Proba nr.											
	2		3		4		5		6		7	
	a	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*
2,5	1,96	9,2	2,88	14,5	3,62	4,2	4,02	2,8	5,60	1,6	6,40	—
4,5	1,90	121,2	2,98	156,2	3,76	60,6	3,95	47,6	5,55	30,3	5,72	11,5
6,5	2,0	143,3	3,15	166,6	4,05	122,4	4,47	90,9	5,20	29,6	5,69	13,3
9,5	2,19	139,6	3,41	159,7	5,09	90,0	5,43	28,6	5,48	16,1	5,79	5,2

a – pH-ul mediului de cultură; *b* – unități PG_1 /lichid de cultură total.

Tabela 5

Activitatea PG_1 din omogenatul de miceliu și greutatea uscată a miceliului dezvoltat pe mediul Raulin tamponat (numărul probei corespunde cu pH-ul inițial al mediului)

Timpul în zile	Proba nr.											
	2		3		4		5		6		7	
	c	*d*	*c*	*d*	*c*	*d*	*c*	*d*	*c*	*d*	*c*	*d*
2,5	0,168	7,2	0,401	5,0	0,690	5,5	0,457	5,3	0,288	10,9	0,172	2,6
4,5	1,132	42,9	1,172	21,8	1,192	14,6	1,215	14,6	0,900	54,5	0,628	31,5
6,5	1,046	62,1	1,022	15,1	1,039	23,6	1,131	16,7	1,024	16,3	0,859	12,6
9,5	0,948	60,3	0,967	14,3	0,875	21,8	0,941	16,2	0,883	12,7	0,871	13,4

c – greutatea micelilului uscat la 105°C, în g; *d* – unități PG_1 /per miceliu total.

Tabela 6

Activitatea PG_1 din miceliu și lichidul de cultură exprimată procentual (*Aspergillus niger* dezvoltat timp de 6,5 zile)

Proba nr.	2	3	4	5	6	7
Activitate totală (unități enzim.)	205,4	181,7	146,0	107,6	45,9	25,9
PG_1 din miceliu %	69,7	91,7	83,8	84,4	64,5	51,4
PG_1 din lichidul de cultură %	30,3	8,3	16,2	15,6	35,5	48,6

celulară. Astfel, de exemplu, la pH = 3,15 PG_1 extracelulară reprezintă 91,7% din activitatea totală, scăzînd pe măsură ce pH-ul mediului crește, încît la pH = 5,69 ea reprezintă doar 51,4%.

Ținînd seama de aceste rezultate, dezvoltarea mucegaiului și producerea poligalacturonazelor a fost urmărită în continuare pe medii de cultură tamponate înainte de sterilizare la pH = 3. După o serie de încercări de tamponare a mediului, făcute cu diferite amestecuri tampon, ne-am oprit la următorul amestec: 18 g KH_2PO_4 + H_3PO_4 85 % pînă la realizarea pH-ului dorit pentru 1000 ml mediu de cultură.

În aceste condiții s-a urmărit desvoltarea miceliului de *Aspergillus niger* și producerea de poligalacturonaze pe mediul Raulin, Czapek și mediul bazal pentru nitrat și asimilarea zahărului [20], tamponate la pH = 3, prelucrîndu-se probele după 3—12 zile. Variațiile de pH înregistrate au fost relativ mici, în medie de 3±0,4. Spre exemplificare, redăm în tabela 7 rezultatele obținute după 5 și 9 zile de dezvoltare a mucegaiului.

Tabela 7

***Aspergillus niger* cultivat pe diferite medii de cultură tamponate la pH = 3**

Timpul în zile	Mediul de cultură											
	Raulin				Czapek				Bazal pt. nitrat și asimilarea zahărului			
	a	*b*	*c*	*d*	*a*	*b*	*c*	*d*	*a*	*b*	*c*	*d*
5	2,86	1,102	25,8	210,5	2,76	0,506	4,8	10,6	0,533	2,90	18,4	36,3
9	3,07	0,979	14,3	256,2	2,85	0,658	6,1	13,9	0,576	3,01	5,1	45,7

a – pH-ul mediului de cultură; *b* – greutatea miceliului uscat la 105 °C, în g; *c* – unități PG_1/miceliu total; *d* – unități PG_1/lichid de cultură.

Rezultatele din această tabelă arată că pe mediul Raulin tamponat se produce o cantitate mai mare de miceliu cît și o cantitate mai mare de PG_1, în comparație cu celelalte medii de cultură folosite.

Luînd în considerare compoziția chimică a acestor medii, rezultă că între ele există diferențe privind unele microelemente și sursa de azot. Menționăm că în cazul tuturor celor trei medii de cultură s-a folosit, ca sursă de carbon, zaharoza, în aceiași cantitate pentru mediul Raulin

şi mediul bazal pentru nitrat şi zahăr şi în cantitate mai mică (conform reţetei [20]) pentru mediul Czapek. Cantitatea totală de azot din mediul Raulin este mai mare decît în celelalte două medii de cultură; faţă de mediul Czapek, care a dat rezultatele cele mai mici de PG_1, mediul Raulin conţine azotul nu numai sub formă de azotat, ci şi sub formă de săruri de amoniu.

Aceste rezultate ne-au condus la ideea de a urmări dezvoltarea miceliului de *Aspergillus niger* şi producerea poligalacturonazelor în prezenţa unor surse diferite de azot. Menţinînd constantă compoziţia chimică a mediului Raulin, cu excepţia substanţelor ce conţin azot, s-au făcut experienţe în prezenţă de: NH_4NO_3, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, $NH_2 \cdot CO \cdot NH_2$ şi mediul Raulin ca atare (care conţine NH_4NO_3, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$. Cantitatea de azot din toate aceste medii de cultură era cea corespunzătoare mediului Raulin. Mediile astfel preparate erau tamponate, în condiţiile arătate, la pH = 3. S-a urmărit: PMG_1 şi PMG_2, precum şi PG_1 şi PG_2 din mediul de cultură. Rezultatele obţinute după cinci zile de cultivare a mucegaiului sînt cuprinse în tabela 8.

Tabela 8

Producţia de miceliu şi de poligalacturonaze în prezenţa diferitelor surse de azot (*Aspergillus niger* cultivat timp de 5 zile)

Sursa de azot	Greutatea uscată a miceliului, g	PMG_1		PG_1		PMG_2		PG_2	
		a	*b* %	*a*	*b* %	$\frac{a}{\times 10^{-2}}$	*b* %	$\frac{a}{\times 10^{-2}}$	*b* %
m. Raulin	1,169	136,9	100	110,4	100	1,28	100	4,90	100
NH_4NO_3	1,131	121,0	88,4	93,1	84,3	1,03	80,5	4,32	88,2
$(NH_4)_2HPO_4$	1,245	214,1	156,4	178,5	161,7	1,20	93,8	5,49	112,0
$(NH_4)_2SO_4$	1,132	196,3	143,4	153,6	139,1	1,32	103,1	5,45	111,2
$NaNO_3$	0,849	0,8	0,6	0,8	0,7	0,66	51.6	0,65	13,3
$NH_2 \cdot CO \cdot NH_2$	1,218	136,3	99,6	107,4	97,3	1,42	110,9	4,88	99,6

a – activitatea poligalacturonazelor din lichidul de cultură, în unităţi enzimatice, raportată la 1 g miceliu uscat; *b* – activitatea poligalacturonazelor redată procentual faţă de activitatea obţinută în mediul Raulin ca atare.

Rezultatele din tabela 8 arată că atît cantitatea de miceliu cît şi cea de poligalacturonaze sînt mai mari în prezenţa sărurilor de amoniu; folosirea azotaţilor ca sursă de azot a dus la o scădere a producţiei de miceliu şi, în special, a celei de poligalacturonaze. Aceste date explică şi rezultatele din tabela 7, obţinute pe mediul Czapek (ce conţine $NaNO_3$), în care atît producţia de miceliu cît şi cea de enzime pectolitice a fost deficitară faţă de cea obţinută pe mediul Raulin.

Ţinînd seama de producţia de poligalacturonaze, sărurile de amoniu utilizate se pot aranja în următoarea ordine (descrescîndă): $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ şi NH_4NO_3, mediul Raulin ca atare şi mediul ce conţine uree situîndu-se între $(NH_4)_2SO_4$ şi NH_4NO_3. Datorită acestor rezultate, în continuarea experienţelor s-a folosit în mediile de cultură $(NH_4)_2HPO_4$, ca singură sursă de azot.

Menţinînd compoziţia chimică a mediului Raulin constantă, cu corectura privind sursa de azot (arătată mai sus) şi exceptînd zaharoza,

care era înlocuită cu diferite glucide, s-a urmărit producția de *Aspergillus niger* și de enzime pectolitice, determinîndu-se activitatea poligalacturonazelor atît în omogenatul de miceliu cît și în lichidul de cultură, la intervale de timp diferite de dezvoltare a mucegaiului. Pentru a avea activitatea totală din fiecare probă, s-a însumat activitatea poligalacturonazică din omogenatul de miceliu (corespunzătoare întregului miceliu) cu cea din lichidul de cultură și s-a raportat la 1 g miceliu uscat la 105°C. Socotind ca martor activitatea poligalacturonazică obținută pe mediul cu zaharoză, s-a exprimat procentual activitatea din celelalte medii de cultură. Rezultatele obținute după 5 zile sînt date în tabela 9.

Tabela 9

Producția de miceliu și de poligalacturonază în prezența diferitelor surse de carbon (*Aspergillus niger* cultivat timp de 5 zile)

Sursa de carbon	Greutatea uscată a miceliului, g	PMG_1		PG_1		PMG_2		PG_2	
		a	*b*%	*a*	*b*%	$a \times 10^{-2}$	*b*%	$a \times 10^{-2}$	*b*%
Glucoză	1,090	391,2	167,2	373,3	159,8	2,9	122,2	9,17	118,5
Fructoză	1,070	213,0	91,1	184,8	79,1	1,42	83,0	7,95	102,7
Galactoză	0,140	85,0	36,3	65,7	28,1	4,64	271,3	6,71	86,7
Zaharoză	1,248	233,8	100	233,5	100	1,71	100	7,74	100
Lactoză	0,199	993,4	424,8	950,2	406,9	8,64	505,3	24,2	313,7
Maltoză	1,002	124,4	53,2	207,1	88,7	1,60	93,6	8,60	111,1
Amidon	0,397	144,3	61,7	128,2	54,9	3,83	224,0	8,41	108,6

a – activitatea poligalacturonazelor (în unități) din miceliu total și lichidul de cultură, raportată la 1 g miceliu uscat; *b* – activitatea poligalacturonazelor redată procentual față de cea obținută în mediu cu zaharoză (100%).

Rezultatele din tabela 9 arată că producția de miceliu și, în special, cea de poligalacturonaze sînt influențate de glucidele folosite ca principală sursă de carbon la prepararea mediilor de cultură. Dacă în prezența zaharozei, glucozei, fructozei și maltozei se obține aproximativ aceeași cantitate de miceliu, producția de poligalacturonaze diferă mult: activitatea PMG_1, PMG_2, PG_1 și PG_2 este mai mare în cazul mucegaiului dezvoltat pe medii cu glucoză față de activitatea obținută în probele cu zaharoză (socotite ca martor), și mai mică (PMG_1, PG_1 și PMG_2) sau foarte puțin crescută (PG_2) în cazul probelor ce conțineau fructoză și maltoză.

Referindu-ne la alte surse principale de carbon utilizate, respectiv la galactoză și amidon, observăm că, în comparație cu zaharoza, producția de miceliu este mult scăzută, la fel și activitatea poligalacturonazelor, cu excepția PMG_2 care crește de mai bine de două ori față de martor.

Interesante ni se par rezultatele obținute prin dezvoltarea mucegaiului *Aspergillus niger* pe medii ce conțin lactoză; cu toate că în prezența lactozei se produce o cantitate relativ mică de miceliu (0,041—0,467 g în interval de 3—9 zile), activitatea poligalacturonazelor este de 3—5 ori mai mare decît aceea obținută prin dezvoltarea mucegaiului în prezența zaharozei.

Ținînd seama de faptul că înseși substanțele pectice, respectiv acizii pectici și pectinici, ar putea constitui surse de carbon pentru *Asper-*

gillus niger, s-au preparat medii de cultură cu aceste substanțe. S-a sperat ca pe această cale producția de poligalacturonaze să crească datorită intervenției fenomenului de biosinteză indusă a enzimelor și faptului că mucegaiul va trebui să se dezvolte în unele probe numai pe seama consumului de substanțe pectice.

Menținînd compoziția chimică a mediului Raulin constantă, cu corectura privind sursa de azot și cu excepția sursei de carbon, s-au preparat medii de cultură ce conțineau: 4% zaharoză, acizi pectinici sau pectici, precum și medii cu 0,5—3% acizi pectinici, respectiv 0,5% acizi pectici, plus zaharoză, pentru a ajunge final la o concentrație în glucide de 4%. Nu s-au preparat medii cu 1—3% acizi pectici, deoarece în prezență de zaharoză și la pH acid acestea se solidifică, formînd un jeleu. Mediile erau tamponate la pH = 3 în condițiile arătate mai sus. Menționăm că pentru a solubiliza substanțele pectice acestea erau mai întîi bine umectate cu etanol (circa 80 ml etanol pentru 1000 ml mediu de cultură), dizolvarea lor în apă făcîndu-se apoi sub continuă și puternică agitare, iar înainte de a fi adusă la volumul final soluția era încălzită (la circa 85—90°C, timp de 30—40 min) pentru îndepărtarea celei mai mari părți a etanolului, care putea împiedica dezvoltarea mucegaiului. După 3, 5, 7, 9 zile de dezvoltare a mucegaiului se determina greutatea uscată a miceliului și activitatea poligalacturonazelor din lichidul de cultură și din omogenatele de miceliu. Activitatea poligalacturonazică corespunzătoare miceliului total s-a însumat cu aceea a lichidului de cultură și s-a raportat la 1 g miceliu uscat la 105°C. S-a socotit ca martor activitatea poligalacturonazică obținută pe mediul ce conține numai zaharoză. Rezultatele obținute după 5 zile de dezvoltare a mucegaiului sînt date în tabela 10.

Tabela 10

Producția de miceliu și de poligalacturonaze în prezența acizilor pectinici și pectici (*Aspergillus niger* cultivat timp de 5 zile)

Sursa de carbon	Greut. uscată a miceliului, g	PMG_1		PG_1		PMG_2		PG_2	
		a	*b*%	*a*	*b*%	$a \times 10^{-2}$	*b*%	$a \times 10^{-2}$	*b*%
Zaharoză 4%	1,211	273,0	100	202,8	100	1,97	100	7,89	100
Acizi pectinici 0,5%	1,276	334,6	122,6	281,7	138,9	2,40	121,8	10,10	128,0
Acizi pectinici 1%	1,186	427,7	156,7	255,9	126,2	2,40	121,8	10,94	138,7
Acizi pectinici 2%	1,169	379,7	139,0	104,0	51,3	2,95	149,7	9,96	126,2
Acizi pectinici 3%	0,876	257,8	94,4	78,4	38,7	3,89	197,5	12,60	159,7
Acizi pectinici 4%	0,487	150,5	55,1	108,4	53,5	6,37	323,4	12,03	152,5
Acizi pectici 0,5%	1,227	258,9	94,8	235,6	116,2	2,89	146,5	10,14	128,5
Acizi pectici 4%	0,257	182,9	66,7	228,4	134,4	4,51	201,3	11,72	148,5

a — activitatea poligalacturonazelor (în unități) din miceliu total și lichidul de cultură raportată al 1 g miceliu uscat; *b* — activitatea poligalacturonazelor redată procentual față de cea obținută în mediu cu zaharoză (100%).

Rezultatele cuprinse în tabelă arată că după 5 zile de dezvoltare a mucegaiului atît producția de miceliu cît și cea de poligalacturonaze sînt influențate de prezența substanțelor pectice din mediul de cultură.

Cantitatea de miceliu scade o dată cu creşterea concentraţiei în substanţe pectice, cu excepţia probelor ce conţineau 0,5% acizi pectici sau pectinici, unde se remarcă o uşoară creştere.

Activitatea PMG_2 şi PG_2 creşte o dată cu cantitatea de substanţe pectice din mediile de cultură. Creşterea activităţii PMG_2 este mai mare (de la $1{,}97.10^{-2}$ — $6{,}37.10^{-2}$) decît aceea corespunzătoare PG_2 (de la $7{,}89.10^{-2}$ — $12{,}03.10^{-2}$). În ceea ce priveşte PMG_1, activitatea acesteia creşte în probele ce conţin pînă la 2% acizi pectinici, fiind maximă la concentraţia de 1%, pentru ca în celelalte probe să scadă, fiind minimă în proba care conţinea numai acizi pectinici.

PG_1 creşte în probele ce conţin acizi pectici şi pectinici pînă la 1%, fiind maximă la concentraţia de 0,5% acizi pectinici, respectiv 4% acizi pectici, şi este minimă la concentraţia de 4% acizi pectinici.

După 9 zile de dezvoltare a miceliului, rezultatele indică o creştere a activităţii PMG_1 (454,8—504,2 unităţi enzimatice) şi PMG_2 ($3{,}24.10^{-2}$ — —$5{,}09.10^{-2}$ unităţi enzimatice) în probele ce conţin 0,5—3% acizi pectinici în mediul de cultură, dar o tendinţă de scădere uşoară a PG_1 (de la 340,9—253,3 unităţi enzimatice) şi a PG_2 ($14{,}31.10^{-2}$—$13{,}0.10^{-2}$ unităţi enzimatice) în aceleaşi probe. Alta este situaţia în cazul dezvoltării miceliului de *Aspergillus niger* în mediile de cultură ce conţin iniţial 4% acizi pectinici. În aceste probe se remarcă o creştere considerabilă a valorilor activităţii enzimatice în comparaţie cu probele ce conţineau iniţial 4% zaharoză, socotite drept martor. Pentru a ilustra aceste fapte, redăm în figurile 1 şi 2 activitatea poligalacturonazelor rezultate în urma dezvoltării mucegaiului pe mediile de cultură ce conţineau 4% zaharoză şi 4% acizi pectinici. Valorile indicate în curbe reprezintă însumarea activităţii poligalacturonazelor din lichidul de cultură şi miceliu, raportate la 1 g miceliu uscat la 105°C.

După cum se vede din figurile 1 şi 2 atît activitatea polimetilgalacturonazelor cît şi a poligalacturonazelor din probele ce conţineau 4% acizi pectininici este mai mare decît aceea din probele cu 4% zaharoză. În general, creşterea activităţii polimetilgalacturonazelor este mai accentuată decît aceea a poligalacturonazelor.

Din totalitatea rezultatelor expuse reiese că atît producţia de miceliu, cît şi cea de poligalacturonaze sînt influenţate şi determinate de compoziţia mediului de cultură în care de dezvoltă *Aspergillus niger*.

Urmărind influenţa pH-ului mediului de cultură asupra producţiei de miceliu şi de poligalacturonaze, a reieşit că tamponarea mediilor la pH-uri acide (2—3) este favorabilă. Totodată, s-a dovedit că prin intermediul pH-ului se poate modifica şi raportul dintre poligalacturonazele intra- şi extracelulare, în acest sens rezultatele fiind similare cu cele observate în cazul formării amilazei în culturile de *Aspergillus oryzae* [24], [25].

Modificarea compoziţiei chimice a mediilor de cultură prin folosirea unor surse diferite de azot a arătat că sărurile de amoniu sînt mai favorabile decît azotaţii, atît pentru dezvoltarea miceliului cît şi pentru producerea poligalacturonazelor. În acest sens, rezultatele coincid cu cele indicate de P. Kontio [16]; în plus faţă de acestea, din datele expuse

rezultă că fosfatul de amoniu ocupă un loc deosebit față de celelalte săruri de amoniu utilizate.

Modificări cantitative ale dezvoltării miceliului și ale producției de poligalacturonaze s-au obținut și prin folosirea diferitelor glucide ca

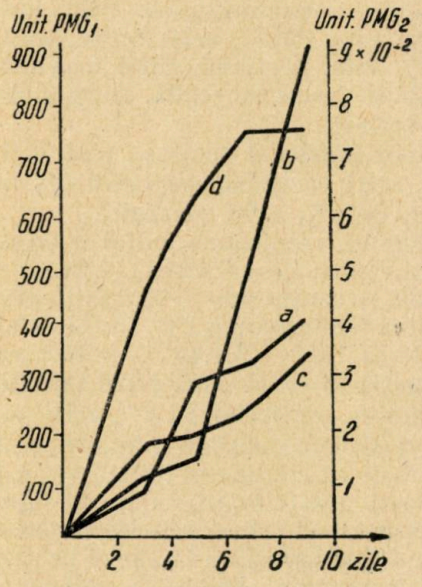


Fig. 1. — Activitatea polimetilgalacturonazelor din *Aspergillus niger* cultivat pe medii cu zaharoză 4% și acizi pectinici 4%.

PMG_1 (*a*) și PMG_2 (*c*) din cultura obținută în prezență de zaharoză; PMG_1 (*b*) și PMG_2 (*d*) din cultura obținută în prezență de acizi pectinici.

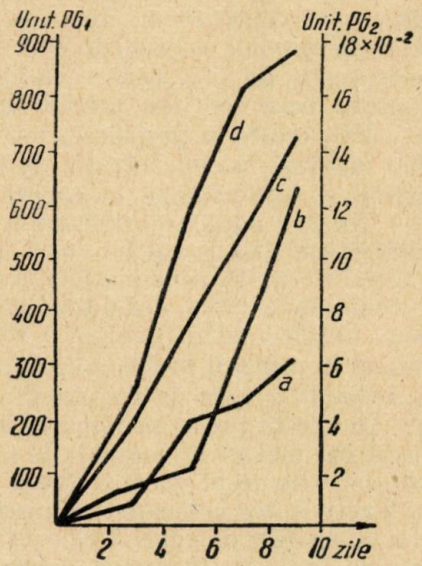


Fig. 2. — Activitatea poligalacturonazelor din *Aspergillus niger* cultivat pe medii cu zaharoză 4% și acizi pectinici 4%.

PG_1 (*a*) și PG_2 (*c*) din cultura obținută în prezență de zaharoză; PG_1 (*b*) și PG_2 (*d*) din cultura obținută în prezență de acizi pectinici.

principale surse de carbon în mediile de cultură, eficiența lor fiind foarte diferită. Rezultatele obținute dovedesc, între altele, că producția de poligalacturonaze nu este proporțională cu cantitatea de miceliu ce se dezvoltă în mediile de cultură. Un exemplu tipic în acest sens îl constituie rezultatele obținute prin utilizarea lactozei: o producție de miceliu relativ mică, însoțită de o activitate pectolitică mare.

Folosirea acizilor pectici și pectinici, singuri sau alături de zaharoză, în mediile de cultură, a dus la o creștere a producției de enzime pectolitice. Este sigur că aceste creșteri sînt datorite biosintezei induse a poligalacturonazelor; totuși, ar fi fost de așteptat ca în prezența substanțelor pectice producția de enzime pectolitice să fie mult mai mare decît cea obținută. Într-adevăr, prin creșterea mucegaiului *Aspergillus niger*, timp de mai multe generații, pe medii ce conțin pectină, s-au obținut randamente mai bune. Vom reveni într-o lucrare viitoare asupra acestor chestiuni.

Rezultatele obținute ne duc la concluzia că poligalacturonazele produse de *Aspergillus niger* (ICA nr. 34) sînt enzime constitutive; activitatea lor crește sau scade în funcție de compoziția mediului pe care se dezvoltă mucegaiul, însă în toate cazurile — chiar și în culturile obținute în absența substanțelor pectice — s-a putut determina activitatea prin metodele folosite.

Activitatea poligalacturonazelor, măsurată prin creșterea puterii reducătoare (folosind ca substrat fie acizi pectici, fie acizi pectinici) sau prin scăderea viscozității acestor substanțe, nu a indicat creșteri sau scăderi simultane. Aceste fapte ar pleda în sensul existenței în culturile de *Aspergillus niger* a mai multor tipuri de poligalacturonaze de specificitate diferită. Într-adevăr, o serie de autori indică acest lucru [3], [6], [15], [16], iar A.L. Demain și H. J. Phaff [1] au dat și o clasificare a diferitelor tipuri de poligalacturonaze. Pentru confirmarea existenței acestora este necesară însă purificarea și separarea lor, ceea ce ne preocupă în prezent.

Prezentată la redacție la 7 noiembrie 1962

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

ПЕКТОЛИТИЧЕСКИЕ ЭНЗИМЫ ИЗ ASPERGILLUS NIGER

I. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗ В СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

РЕЗЮМЕ

При определении активности полигалактуроназ путем снижения вязкости и усиления восстанавливающей способности реакционной среды, содержащей пектовые или пектиновые кислоты, следят за выделением мицелия и полигалактуроназ в поверхностных культурах плесени Aspergillus niger.

Выделение как мицелия, так и полигалактуроназ зависит от состава питательной среды и даже определяется им. Использование буфера (pH = 2—3) для среды с KH_2PO_4 и H_3PO_4 способствует выделению полигалактуроназ. Изменение pH-а среды приводит к изменению отношения внутри- и внеклеточной полигалактуроназы.

Использование различных источников азота показало, что аммонийные соли, больше чем азотнокислые, способствуют развитию мицелия, а также выделению полигалактуроназ. Среди испробованных солей аммония, лучшие результаты были получены с $(NH_4)_2 HPO_4$.

Глициды, использованные как источник углерода, выявляют различную эффективность. Их можно расположить с этой точки зрения по следующему ряду, в котором эффективность понижается: лактоза,

глюкоза, сахароза, фруктоза, крахмал, мальтоза и галактоза. Использование в качестве источников углерода пектовых или пектиновых кислот, как таковых, или вместе с сахарозой приводит к повышению выделения пектолитических ферментов.

Выделение полигалактуроназ не пропорционально выделению мицелия. Полигалактуроназы, выделенные Aspergilus niger (А.И.И. № 34), являются составляющими ферментами; их активность повышается или понижается в зависимости от состава среды, на которой развивается плесень, но во всех случаях, даже и в средах, полученных без пектовых веществ, удалось, определить, активность с помощью примененных методов.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Активность полиметилгалактуроназ из Aspergillus niger, культивированном на средах с 4 %-ой сахарозой и 4 %-ыми пектиновыми кислотами. PMG_1 (*a*) и PMG_2 (*c*) из культуры, полученной в присутствии сахарозы. PMG_1 (*b*) и PMG_2 (*d*) — из культуры, полученной в присутствии пектиновых кислот.

Рис. 2. — Активность полигалактуроназ из Aspergillus niger, культивированном на средах 4 %-ой сахарозой и 4 %-ыми пектиновыми кислотами.

PG_1 (*a*) и PG_2 (*c*) — из культуры, полученной в присутствии сахарозы.

PG_1 (*b*) и PG_2 (*d*) — из культуры, полученной в присутствии пектиновых кислот.

ENZYMES PECTOLYTIQUES DE L'*ASPERGILLUS NIGER*

I. PRODUCTION DES POLYGALACTURONASES DANS DES MILIEUX SYNTHÉTIQUES

RÉSUMÉ

On a étudié la production de mycélium et de polygalacturonases dans les cultures superficielles d'*Aspergillus niger*, en déterminant l'activité des polygalacturonases par la diminution de la viscosité et par l'accroissement du pouvoir réducteur du milieu de réaction contenant des acides pectiques ou pectiniques.

La production de mycélium, tout comme celle de polygalacturonases, est influencée et déterminée par la composition du milieu de culture. Le tamponnement du milieu avec KH_2PO_4 et H_3PO_4 à un pH acide (2—3) favorise la production de polygalacturonases. Une modification du pH du milieu entraîne une modification du rapport entre les polygalacturonases intra- et extra-cellulaires.

L'utilisation de diverses sources d'azote a montré que les sels d'ammonium sont plus favorables que les azotates aussi bien pour le développement du mycélium que pour la production des polygalacturonases. Parmi les sels d'ammonium utilisés, le $(NH_4)_2HPO_4$ a donné les meilleurs résultats.

Les glucides utilisés en tant que sources de carbone présentent une efficacité variable. Ils peuvent être classifiés selon leur efficacité décrois-

sante comme suit : lactose, glucose, saccharose, fructose, amidon, maltose et galactose. L'utilisation des acides pectiques et pectiniques, seuls ou avec la saccharose, comme sources de carbone, entraîne une hausse de la production d'enzymes pectolytiques.

La production de polygalacturonases n'est pas proportionnelle à celle de mycélium. Les polygalacturonases produites par l'*Aspergillus niger* (I.C.A. n° 34) sont des enzymes constitutives ; leur activité s'accroît ou baisse en fonction de la composition du milieu où se développe la moisissure, mais dans tous les cas, même dans les cultures exemptes de substances pectiques, on en a pu déterminer l'activité par les méthodes utilisées.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Activité des polyméthylgalacturonases de l'*Aspergillus niger* cultivé sur des milieux à 4% de saccharose et à 4% d'acides pectiniques.

PMG_1 (*a*) et PMG_2 (*c*) de la culture obtenue en présence de la saccharose ; PMG_1 (*b*) et PMG_2 (*d*) de la culture obtenue en présence des acides pectiniques.

Fig. 2. — Activité des polygalacturonases de l'*Aspergillus niger* cultivé sur des milieux à 4% de saccharose et à 4% d'acides pectiniques.

PG_1 (*a*) et PG_2 (*c*) de la culture obtenue en présence de la saccharose ; PG_1 (*b*) et PG_2 (*d*) de la culture obtenue en présence des acides pectiniques.

BIBLIOGRAFIE

1. A. L. DEMAIN, H. J. PHAFF, *Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances.* Wallerstein Labs. Commun., **20**, 119 (1957).
2. D. S. PATEL, H. J. PHAFF, *Mecanism of action of yeast endopolygalacturonases on oligogalacturonides and their reduced and oxidized derivs.* J. Biol. Chem., **234**, 237 (1959).
3. R. TUTTOBELLO, P. J. MILL, *The pectic enzymes of Aspergillus niger. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes.* Bioch. J., **79**, 51 (1961).
4. P. J. MILL, R. TUTTOBELLO, *The pectic enzymes of Aspergillus niger. 2. Endopolygalacturonase.* Bioch. J., **79**, 57 (1961).
5. A. AYRES, J. DINGLE, A. PHIPPS, W. W. REID, G. L. SOLOMONS, *Enzymic degradation of pectic acid and the complex nature of polygalacturonase.* Nature, **170**, 834 (1952).
6. E. SCHUBERT, *Diferentiation of the polygalacturonases of Aspergillus niger.* Nature, **169**, 931 (1952).
7. H. J. PHAFF, A. L. DEMAIN, *The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase.* J. Biol. Chem., **218**, 875 (1956).
8. L. LINEWEAVER, E. F. JANSEN, *Pectic enzymes.* Adv. Enzymol., **11**, 267 (1951).
9. H. DEUEL, E. STUTZ, *Pectic substances and pectic enzymes.* Adv. Enzymol., **20**, 341 (1958).
10. R. K. S. WOOD, *Pectic enzymes produced by Bacterium oroideae.* Nature, **167**, 771 (1951).
11. J. S. COLE, *Studies in the physiology of parasitism. XX. The pathogenicity of Botrytis cinerea, Sclerotinia fructigena and Sclerotinia laxa with special reference to the part played by pectolytic enzymes.* Ann. Botany (London), **20**, 15 (1956).
12. H. J. PHAFF, *The production of exocellular pectic enzymes by Penicillium Chrysogenum. I. On the formation and adaptive nature of polygalacturonase and pectinesterase.* C. A., **41**, 6302 f (1947).
13. B. S. LUH, H. J. PHAFF, *Polygalacturonase of certain yeasts.* Arch. Biochem. Biophys., **33**, 212 (1951).
14. H. J. SAITO, *Pectic glycosidases of Aspergillus niger.* C. A., **51**, 15641 g (1957).
15. H. J. SAITO, *Pectic glycosidases of Aspergillus niger.* C. A., **52**, 4746 f (1958).

16. P. KONTIO, *Formation of pectic enzymes by Aspergillus niger.* C. A., **46**, 10274 b (1952).
17. Z. I. KERTESZ, *The pectic substances.* Interscience. Publish Inc., New York—London, 1951, 110, 376.
18. I. VASILESCU, *Limpezirea sucurilor de fructe cu preparate enzimatice pectolitice.* I.C.A. Bibl. Tehn., 2, Bucureşti (1954).
19. Ст. АНГЕЛОВ, Ив. ГРИГОРОВ, П. ПАНАЙОТОВ, М. МАРИНОВ, *Пектинезен препарат „Бистрин", добит в Микробиологическия Институт на Бан. сровнен с Вносните бистрителни препарати.* Изв. микробиол. Инст., книга II, 5 (1951).
20. A. JÖRGENSEN, *Microorganismen der Gärungsindustrie.* Verlag Hans Carol, Nürnberg, 1956, 522—543.
21. R. P. NEWBOLD, M. A. JOSLYN, *Chemistry of annaliticaly important pectic acids.* J. Ass. Official Agr. Chem., **35**, 872 (1952).
22. E. F. JANSEN, L. R. MCDONNEL, *Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase.* Arch. Biochem., **8**, 97 (1945).
23. Z. I. KERTESZ, Polygalacturonases, în S. P. Colwick, N. O. Kaplan, *Methods in enzymology.* Acad. Press Inc., New York, 1955, **1**, 162.
24. R. V. FENIKSOVA, *The physiology of nutrition of Aspergillus oryzae in relation to the formation of active amylase by this fungus.* Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem., Tokyo — Kyoto, Pergamon Press. London—New York, Paris—Los Angeles, 1957, 482.
25. K. STEINER, *Über den Einfluss von Spurenelementen auf Wachstum und Enzymbildung von Aspergillus oryzae (Ahlburg) Cohn.* Zentralblatt Bakt. Parasit. Infektionsk. Hygiene. II Abt., **114**, *1*, 47 (1961).

ELABORAREA DE ANTICORPI ÎN STAREA DE INHIBIȚIE ȘI EXCITAȚIE MEDICAMENTOASĂ

DE

D. MOȚET-GRIGORAȘ și C. DRAGOMIRESCU

Una din căile prin care s-a cercetat rolul sistemului nervos central în elaborarea anticorpilor a fost imunizarea animalelor aflate în stare de inhibiție sau excitație medicamentoasă. Rezultatele obținute au fost însă adesea contradictorii. Multe lucrări arată o scădere a elaborării de anticorpi la animalele aflate în stare de inhibiție [1], [2], [3], [4], [5]. Pe de altă parte, B. L. Mazur și G. A. Berlin [6] nu constată nici o modificare a titrului aglutininelor specifice în urma somnului medicamentos, în timp ce I. V. Budîlin [7] găsește chiar o creștere a acestora în cazul narcozei intermitente.

Rezultatele sînt contradictorii și în ceea ce privește elaborarea de anticorpi la animalele aflate în stare de excitație. Astfel, unii cercetători au constatat o creștere a titrului de anticorpi în aceste condiții [4], [8], [9], [10], [11]. Alții, ca Cernov și Poluboianova [12], nu au găsit nici o modificare, în timp ce I. V. Budîlin [7] a constatat chiar o scădere a titrului de anticorpi la animalele aflate în stare de excitație.

Pe marginea acestor experiențe se pot face însă unele observații.

Cu foarte rare excepții, imunizările s-au efectuat utilizîndu-se ca antigeni, toxine sau anatoxine. Este însă greu de crezut că astfel de antigeni nu ar exercita asupra organismului și acțiuni secundare, ceea ce poate influența rezultatele experiențelor, fiind una din cauzele rezultatelor contradictorii menționate. Din acest motiv, în experiențele noastre am folosit ca antigen proteinele serului sangvin uman.

Apoi trebuie să ținem seama că în cazul inhibiției sau excitației permanente a organismului metabolismul este modificat, ceea ce se poate răsfrînge și asupra biosintezei anticorpilor. Aceasta se suprapune peste eventuala acțiune a sistemului nervos. De asemenea, în cazul cînd animalul este supus unei narcoze prelungite, alimentația nu este normală, circulația este mai slabă și, în general, metabolismul este încetinit, ceea ce influențează desigur procesele de resorbție a antigenilor și de elaborare a anti-

corpilor. Narcoza prelungită poate fi deci factorul care a făcut ca unii autori să constate o scădere sau o întîrziere a biosintezei anticorpilor. De altfel, I. V. Budîlin [7], în cazul narcozei intermitente, deci cînd activitățile vitale ale animalului nu sînt perturbate, a găsit că elaborarea anticorpilor nu numai că nu scade, dar chiar crește.

Pentru a evita modificările ce survin în cazul narcozei prelungite, în experiențele noastre am făcut animalelor o singură injecție de narcotic pe zi, dimineața, după alimentare, astfel încît animalele se trezeau după cîteva ore, se hrăneau normal și făceau mișcare înaintea somnului fiziologic de noapte.

Aceleași lucruri se pot spune, desigur în sens invers, și în cazul animalelor excitate. De aceea, credem că introducerea substanței excitante o singură dată pe zi, dimineața, spre a nu perturba somnul de noapte și a nu duce la uzura organismului, este de asemenea de preferat.

În cazul lucrării de față am făcut două serii de experiențe. În prima serie am hiperimunizat iepuri în greutate între 2—2,5 kg, după o schemă asemănătoare aceleia a lui P. Grabar [13]. În prima săptămînă am injectat, subcutanat, un amestec de 0,5 ml ser uman, cu 1,5 ml soluție de NaCl fiziologică și 2 ml adjuvant Freund; în a doua săptămînă am injectat 1 ml ser, cu 1 ml soluție de NaCl fiziologică și 2 ml adjuvant; în a treia săptămînă — 2 ml ser și 2 ml adjuvant, pentru ca în săptămînile 4, 5 și 6 să injectăm de patru ori pe săptămînă ser diluat (1 parte ser la 8 părți soluție de NaCl fiziologică), fără adjuvant, în următoarele cantități: săptămîna a 4-a cîte 0,5 ml, săptămîna a 5-a cîte 1 ml și săptămîna a 6-a cîte 2 ml. Sîngerarea s-a făcut la 8—10 zile după ultima injecție.

Iepurii au fost împărțiți în 3 loturi: martor, excitați prin injecții cu cafeină citrică și inhibați prin injecții cu medinal.

S-a făcut zilnic cîte o injecție dimineața, începînd cu 3 zile înaintea primei introduceri de antigen și continuînd pînă la sîngerare. Dozele introduse au fost de 0,1 g/kg cafeină și 0,15 g/kg medinal.

Determinarea titrurilor serurilor provenite de la cele trei loturi nu a arătat nici o deosebire între iepurii excitați, inhibați și martori (1 : 64 000). De asemenea, analiza imunoelectroforetică nu a reușit să pună în evidență vreo diferență din punct de vedere al numărului liniilor de precipitare.

Pentru a urmări efectul injecțiilor singulare, am efectuat o a doua serie de experiențe. Injecțiile cu medinal și cafeină citrică au fost administrate ca și la experiențele anterioare. Antigenul, tot ser sangvin uman, a fost introdus subcutanat, în amestec cu gel de hidroxid de aluminiu ca adjuvant. Antigenul a fost introdus în doze mari, de 4 ml, la fiecare injecție.

După 12 zile de la injecție am determinat titrul celor trei loturi și am făcut analiza imunoelectroforetică. Nici una din aceste probe nu a arătat vreo diferență între animalele ținute în stare de excitație sau inhibiție și animalele martor (titrul = 1 : 1 280).

În ziua a 14-a după prima imunizare s-a făcut o a doua injecție de antigen, identică cu prima. După 14 și 21 zile de la a doua injecție, titrul (1 : 24 000) ca și aspectul imunoelectroforetic nu au diferit față de

martori nici la lotul de iepuri în stare de excitație, nici la cel în stare de inhibiție.

În concluzie, putem spune că imunizînd iepurii cu un antigen nepatogen și netoxic (ser sangvin uman), în condiții de inhibiție și excitație medicamentoasă în care, prin faptul că substanța era introdusă în organism o singură dată pe zi, dimineața, activitatea vitală a animalului nu era perturbată, nu am găsit nici o modificare față de animalele martor, nici în titrul de anticorpi și nici în aspectul imunoelectroforetic.

Prin aceasta se confirmă datele obținute de B. L. Mazur și T. A. Berlin [6] în condiții de inhibiție și de Cernov și Poluboianova [12] în excitație.

Se pare deci că elaborarea de anticorpi nu se află sub reglajul cortical, ci sub acela al unor regiuni inferioare ale sistemului nervos, neafectate de inhibiția sau excitația ce se realizează prin dozele și în condițiile de administrare ale substanțelor medicamentoase utilizate în lucrarea de față.

Prezentată la redacție la 9 noiembrie 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В СОСТОЯНИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ТОРМОЖЕНИЯ И ВОЗБУЖДЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

Авторы иммунизировали кроликов непатогенным и нетоксичным антигеном (человеческой кровяной сывороткой), в условиях лекарственного торможения и возбуждения. Благодаря тому, что вещество вводили в организм один раз в день (утром), жизненная деятельность организма не нарушалась. В этих условиях не было констатировано изменений, по сравнению с контрольными животными, ни в отношении титра антител, ни в отношении иммуноэлектрофорезиса.

Полученные данные подтверждают результаты Мазура и Берлина в условиях торможения и Чернова и Полубояновой — в условиях возбуждения.

ÉLABORATION D'ANTICORPS EN ÉTAT D'INHIBITION ET D'EXCITATION MÉDICAMENTEUSE

RÉSUMÉ

Les auteurs ont immunisé à l'aide d'un antigène non pathogène et non toxique (sérum sanguin humain) des lapins mis en état d'inhibition et d'excitation médicamenteuse. La substance étant introduite dans

leur organisme une seule fois par jour, le matin, l'activité vitale des animaux n'était pas perturbée. Dans de telles conditions on n'a pas constaté de modifications par rapport aux témoins, ni dans le titre d'anticorps, ni dans l'aspect immuno-électrophorétique.

On confirme de cette manière les résultats obtenus par Mazur et Berlin dans les conditions d'inhibition et par Tchernov et Poluboïanova à l'état d'excitation.

BIBLIOGRAFIE

1. Германов Н. И., *Продукция антител в условиях торможения нервной системы.* Журн. микробиолог., эпидемиол. и иммунобиол., *12*, 33, 1953.
2. Учитель И. Я., *Действие медикаментозного сна на выработку специфических противотел.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *4*, 80, 1954.
3. Стригин, В. А., *Влияние угнетения нервной системы на инфекцию и иммунитет. Влияние длительного уретано-веронального сна на продукцию брюшнотифозных агглютининов при ревакцинации.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *12*, 19—21, 1953.
4. Палант Б. Л., *Значение торможения и возбуждения в иммуногенезе.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *3*, 89, 1954.
5. Ефимова Н. П., Калугина Л. В., *Влияние нервного возбуждения на образование иммунитета при дифтерии.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиолог., *12*, 21—27, 1953.
6. Мазур Б. Л., Берлин Г. А., *Влияние охранительного торможения на некоторые патологические процессы.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *12*, 14—18, 1953.
7. Будылин И. В., *К вопросу о влиянии центральной нервной системы на образование иммунотел.* Журн. микробиол., эпидемиолог. и иммунобиол., *9*, 53, 1953.
8. Мельников В. Н., *Влияние медикаментозного возбуждения центральной нервной системы на течение брюшнотифозной токсикоинфекции у белых мышей и накопление агглютининов при ревакцинации у кроликов.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *7*, 33—38, 1954.
9. Савчук О. Е., *К вопросу о рефлекторном механизме выработки антител.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *2*, 131—132, 1958.
10. Каменецкая Р. П., Мельник-Шер С. Б., *Влияние некоторых препаратов, возбуждающих и угнетающих нервную систему, на развитие иммунитета при экспериментальной дизентерии Григорьева-Шига у кроликов.* Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., *4*, 68—75, 1954.
11. Тульчинская В. П., Апляк И. В., *Иммунобиологические реакции у лабораторных животных, иммунизированных живой бруцеллезной вакциной при различных состояниях нервной системы.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., *5*, 56, 1955.
12. Zilber L. A., *Bazele imunologiei.* Ed. med., Buc., 1959, 225.
13. Grabar P., Coulcon J., *Étude des sérums de cheval, lapin, rat et souris par l'analyse immunoélectrophorétique.* Bul. Soc. Chim. Biol., *40*, 1993 (1958).

ENERGIA DE ACTIVARE A REACȚIEI DE DESCOMPUNERE A H_2O_2 DE CĂTRE CATALAZĂ LA SOIURILE DE CARTOFI SENSIBILE ȘI LA CELE REZISTENTE LA ATACUL CIUPERCII *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

DE

V. EȘANU

În ultimii ani studiul mecanismului imunității a cunoscut un avînt însemnat. Este un fapt stabilit că proprietatea organismelor vegetale de a rezista la atacul organismelor patogene este în funcție de metabolism și că modificarea acestuia, pe o cale sau alta, duce, într-o anumită măsură, la modificări corespunzătoare în proprietățile de rezistență ale organismului gazdă [2], [8], [11], [13], [14], [15]. În aceste fenomene, un rol esențial s-a dovedit a fi jucat de procesele enzimatice, în special de cele legate de respirație și fosforilare [3], [5], [6], [7], [9], [16]. Datele din literatură, precum și cercetările noastre au arătat că, dintre enzimele oxido-reducătoare, catalaza prezintă o anumită sensibilitate față de acțiunea parazitului și condiționează, într-o anumită măsură, capacitatea de rezistență a gazdei [4], [10], [12].

În ciuda materialului destul de bogat existent, aproape că nu există cercetări care să vizeze mecanismul rezistenței, prin studierea enzimelor chiar în esența acțiunii lor, adică în capacitatea lor de a micșora energia de activare a reacției pe care ele o catalizează.

În această comunicare prezentăm date asupra energiei de activare a reacției de descompunere a H_2O_2 de către catalaza din frunzele neinfectate ale unor soiuri de cartof cu diferite grade de rezistență la atacul ciupercii *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry, recoltate în cîteva momente ale perioadei de vegetație, cîte 2 zile consecutiv, de la începutul dezvoltării butonilor florali pînă la căderea petalelor. S-a experimentat pe soiurile *Săpunar*, *Viola*, *Gülbaba*, cunoscute ca sensibile, și pe soiurile *Robusta* și *Fitoftoroustoicivîi*, cunoscute ca rezistente. Plantele au fost crescute în

Tabela 1

Variația energiei de activare (μ) și a coeficientului termic (Q_T) a reacției de descompunere a H_2O_2 de către catalaza soiurilor de cartofi sensibile și rezistente la atacul ciupercii *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry

Soiul \ Data		1959						1960					
		9 VI – 10 VI		23 VI – 26 VI		6 VII – 10 VII		7 VI – 8 VI		9 VII – 11 VII		23 X – (seră)	
Săpunar (1959)	Q_T	3,7	2,5	2,3	3,4	2,6	2,6	2,8	2,6	4,47	4,1	2,94	2,84
Gülbaba (1960)	μ	11482,0	10041,7	6151,0	10105,0	7520,0	6627,0	7416,0	6742,0	13141,1	10985,0	9464,8	9160,0
Viola	Q_T	3,1	3,4	1,5	–	3,2	2,9	3,7	3,5	–		2,92	3,04
	μ	9872,0	10918,0	9988,1	–	10180,0	8024,0	9352,0	8731,0	–		9404,1	9757,9
Fit. ust.	Q_T	2,7	2,3	2,6	–	2,0	2,4	2,4	2,7	2,2	2,3	2,17	–
	μ	8781,0	7423,0	6716,0	–	6083,0	6062,0	6314,0	6819,0	5919,0	7309,6	6799,0	–
Robusta	Q_T	1,3	1,5	2,8	2,6	1,8	1,6	1,8	2,1	–		2,43	2,34
	μ	2633,0	3499,7	7468,9	7541,9	5493,2	3827,0	4415,0	5145,0	–		7792,2	7461,3

cîmp, respectîndu-se toate regulile agrotehnice, iar în 1960 s-au făcut şi experienţe în seră. Analizele au fost făcute pe probe medii de frunze — întregi sau numai cîte o foliolă — luate de la 10—15 plante, totdeauna de la acelaşi etaj — al 6-lea socotit de la vîrf către bază. Experienţele s-au efectuat în 2 ani, diferiţi în privinţa condiţiilor climatice. Catalaza s-a determinat gazometric [1].

Energia de activare s-a calculat după relaţia lui Arrhenius

$$\mu = R \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \ln Q_T$$

în care T_1 şi T_2 sînt temperaturile absolute la care s-a determinat activitatea enzimei ($T_1 = 277°C$, respectiv 4°C, iar $T_2 = 295{,}5 - 299°C$, respectiv 22,5 — 26°C).

Coeficientul termic Q_T s-a calculat după formula: $Q_T = \frac{k_2}{k_1}$ în care k_2 şi k_1 sînt vitezele de reacţie la cele două temperaturi. Vitezele de reacţie s-au calculat după relaţia: $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}$ în care t = timpul de reacţie (în minute), x = numărul de ml O_2 degajaţi după timpul t, iar a este numărul de ml O_2 degajaţi pînă la epuizarea apei oxigenate.

Din tabela prezentată, în care fiecare cifră reprezintă media a 3—5 determinări, se constată că, de regulă, la soiurile cu o rezistenţă mai mare energia de activare este mai mică decît la cele cu o rezistenţă mai scăzută. Această proprietate se arată a fi independentă atît de condiţiile climatice, cît şi de nivelul absolut al activităţii enzimei. De asemenea, caracteristica aceasta îşi păstrează valabilitatea chiar dacă activitatea catalazei devine mai intensă la soiurile mai rezistente, aşa cum s-a întîmplat în încercările din seră (27.X.1960), spre deosebire de cele din cîmp cînd intensitatea activităţii catalazei era mai mică la soiurile rezistente. Se pare, deci, că una din proprietăţile caracteristice ale soiurilor de cartof cu un grad mai mare de rezistenţă la atacul ciupercii *Phytophthora infestans* este capacitatea crescută a catalazei de a micşora energia de activare a reacţiei de descompunere a apei oxigenate. Însemnătatea biologică a acestei proprietăţi s-ar părea că rezidă în faptul că ea conferă acestor soiuri o capacitate mărită de a suporta modificările survenite în urma interacţiunii cu parazitul.

Prezentată la redacţie la 28 octombrie 1962

Institutul de biologie „Traian Săvulescu"
al Academiei R.P.R.,
Secţia de fitopatologie şi microbiologie

ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ РЕАКЦИИ РАЗЛОЖЕНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПОД ВЛИЯНИЕМ КАТАЛАЗЫ У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К ДЕЙСТВИЮ ГРИБКА PHYTOPHTHORA INFESTANS

РЕЗЮМЕ

В работе определялась энергия активации реакции разложения перекиси водорода под влиянием каталазы листьев некоторых сортов картофеля, различной степени устойчивости по отношению к действию грибка Phytophthora infestans (Mont.) de Barry но не зараженных этими грибками.

Было констатировано, что энергия активации меньше у более устойчивых сортов и что она не зависит от степени активности фермента, от климатических условий и от вегетативной фазы.

ÉNERGIE D'ACTIVATION DE LA RÉACTION DE DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE PAR LA CATALASE CHEZ LES VARIÉTÉS DE POMMES DE TERRE SENSIBLES ET CHEZ CELLES RÉSISTANTES À L'ATTAQUE DU CHAMPIGNON *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

RÉSUMÉ

On a étudié l'énergie d'activation de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase des feuilles de quelques variétés de pommes de terre manifestant une résistance variable à l'attaque du champignon *Phytophthora infestans* (Mont.) de Barry, mais n'ayant pas été infectées par ces cryptogames.

On constate que l'énergie d'activation est moindre chez les variétés résistantes et qu'elle est indépendante du niveau de l'activité de l'enzyme, des conditions climatiques et de la phase de végétation.

BIBLIOGRAFIE

1. Ермаков А. Т., Арасимович, В. В., Смирнова-Иконикова М. И., Мурий И. К., *Методы биохимического исследования растений.* Москва, Сельхозгиз, 1952.
2. Esanu V., Negulescu Fl., *Influenţa cîtorva microelemente asupra variaţiei unor indici fiziologici şi biochimici la plantele de porumb sănătoase şi atacate de ciuperca Ustilago zeae /Beckm./Unger.* Analele ICAR, **XXVII**, Seria C 59—68 (1959).
3. Esanu V., Negulescu Fl., *Modificări ale procesului respirator la germenii de porumb trataţi cu $ZnSO_4$ în vederea măririi rezistenţei la tăciunele produs de ciuperca Ustilago zeae /Beckm./Unger.* Studii şi cercetări de biochimie, **3**, 293—297 (1960).

4. ESANU V., NEGULESCU FL., *Influența atacului ciupercii Ustilago zeae /Beckm./ Unger asupra unor procese fiziologice și biochimice din planta gazdă.* Studii și cercetări de biologie, seria biologie vegetală, **X**, *3*, 303—309 (1958).
5. FARKAS G. L., KIRALY Z., *Enzymological aspects of plant diseases. I. Oxidative enzymes* Phytopath. Zeitschrift, **31**, *3*, 251—272 (1958).
6. ФАРКАШ Г. К., КИРАЛИ З., *Изучение энзимологии больного растения в связи с устойчивостью его к микроорганизмам.* Изв. Акад. Наук СССР, Биол., *5*, 47—56 (1956).
7. NICOLAS G., *Sur la réspiration des plantes parasitées par des champignons.* Compt. Rend. Acad. Sci., 170, 750—752 (1920).
8. РЭФЭИЛЭ К., ТУША К., НЕГУЛЕСКУ Ф., ЭШАНУ В., *Повышение урожайности и устойчивости кукурузы к головне путем химической обработки семян.* Тезисы докладов III Всесоюзного совещания по иммунитету растений к болезням и вредителям. Кишинев, 1959.
9. РУБИН Б. А., ЧЕТВЕРИКОВА Е. П., АРЦИХОВСКАЯ Е. В., *Окислительная система и иммунитет растений.* Ж. общей биол., **16**, *2*, 106—119 (1955).
10. РУБИН В. А., СОКОЛОВА В. Е., САВЕЛЕЕВА О. Н., *Некоторые особенности обмена растений картофеля, пораженных морщинистой мозаикой.* Докл. Акад. Наук СССР, **109**, *6*, 1180—1182 (1956).
11. РУБИН Б. А., *Биохимические основы иммунитета растений.* Тезисы докладов III Всесоюзного совещания по иммунитету растений к болезням и вредителям. Кишинев, 1959.
12. SĂVULESCU A., STĂNESCU N., ESANU V., *Schimbări în activitatea fiziologică a plăntuțelor de grîu atacate de ciuperca Ustilago tritici /Pers./ Jensen.* Analele ICAR, 2, 5, 6 (1958).
13. SĂVULESCU TR., SĂVULESCU A., *Cîteva probleme ale rezistenței și imunității plantelor în lumina cercetărilor romînești.* Vol. omagial Gh. Ionescu-Sișești, Ed. Acad. R.P.R., 1961.
14. SEMPIO C., *Meccanismi di resistenza nelle piante con particulare riguardo a quelle di tipo metabolico.* Atti Acad. Bengof, Firenze, (1949), 10 p., 1950 /RAM, 1953, XXXII, 10, 583.
15. SEMPIO C., *Metabolic resistence to plante disease,* Phytopath. **40**, *9*, 799—819 (1950).
16. STĂNESCU NELI, *Schimbări fiziologice și biochimice produse de ciuperca Ustilago tritici /Pers./ Jensen în plantele de grîu.* Studii și cercetări de biologie, seria biologie vegetală **XII**, *4*, 129—140 (1960).

LEZIUNE BIOCHIMICĂ ERITROCITARĂ PUSĂ ÎN EVIDENȚĂ CU AJUTORUL FOSFORULUI RADIOACTIV*)

DE

GR. TURCU, P. TEITEL și V. BRATU**)

Metabolismul eritrocitar reprezintă o problemă relativ recentă, a cărei cercetare a devenit posibilă datorită introducerii tehnicilor moderne în biochimie (utilizarea izotopilor, a cromatografiei pe hîrtie și pe schimbători de ioni, a radiocromatografiei, a spectrofotometriei etc.), tehnici care au permis studii la nivel subcelular.

Aspectele biochimice ale fiziologiei și patologiei eritrocitului au început să intereseze în măsură tot mai însemnată pe hematologi, plecînd de la faptul că asigurarea condițiilor optime de conservare a sîngelui pentru transfuzii constituie o problemă de biochimie. Alterarea principală a sîngelui după o conservare prelungită este o „leziune biochimică". Pe de altă parte, în ultimii ani s-au putut pune în evidență modificări bine precizate ale metabolismului intraeritrocitar, care determină apariția unor tipuri de anemii hemolitice al căror mecanism de producere era mai înainte complet necunoscut. Atribuirea acestor tipuri de anemii „defectului intrinsec globular" nu elucidează problema etiologiei și patogeniei lor, întrucît acest termen vechi — care astăzi nu-și mai găsește justificare — nu face altceva decît să acopere lacune ale cunoștințelor noastre în domeniul patologiei subcelulare.

Leziunile metabolice ale eritrocitului determină, în ultimă analiză, o scurtare a duratei de viață a acestei celule în circuitul sanguin, adică o scădere a „viabilității" sale.

Relațiile dintre leziunile metabolice și modificările viabilității eritrocitare sînt studiate în special la nivelul *metabolismului energetic celular*

*) Lucrare comunicată la „Simpozionul pentru utilizarea izotopilor radioactivi în biologie și medicină", Cluj, 25—27 mai, 1962.

**) Colaboratori tehnici : M. Zaharia, A. Leontenescu

deoarece acest metabolism este de importanță fundamentală pentru menținerea integrității morfologice și funcționale a oricărei celule [1].

Una din metodele cel mai frecvent utilizată în studiul metabolismului energetic al eritrocitului este urmărirea cineticii incorporării și distribuției fosforului radioactiv în componenții intracelulari. Justificarea acestui procedeu de analiză se bazează pe rolul central al anionului fosforic în desfășurarea metabolismului energetic.

În lucrarea de față am urmărit să punem în evidență modificarea metabolismului energetic al unor eritrocite patologice, ce prezentau o scurtare a duratei de viață *in vivo*, care a fost depistată în laboratorul nostru prin marcarea lor cu crom radioactiv*). În acest scop s-a studiat — într-un sistem experimental *in vitro* — a) viteza de incorporare a fosforului radioactiv din plasmă în globul și b) repartizarea trasorului între diferitele fracțiuni cromatografice ale extractului acido-solubil din eritrocite.

MATERIAL ȘI METODĂ

Sîngele provenea de la doi bolnavi (St. C. și Pr. D.) ale căror globule roșii aveau o durată de viață scurtată (20, respectiv 80 de zile). Ca martor s-a studiat în aceleași condiții sînge provenind de la patru donatori sănătoși.

S-au recoltat cîte 12 ml de sînge pe 2 ml de soluție stabilizatoare nr. 7 a Centrului de hematologie**). În fiecare probă s-a introdus cîte 1 ml soluție de fosfat radioactiv de sodiu ($Na_2H^{32}PO_4$), cu activitate specifică de 20 μC/ml, în soluție salină izotonică, tamponată la pH 7,3 (tampon fosfat). După omogenizare s-au oprit cîte 5 ml din fiecare probă, pentru stabilirea valorilor la $t = 0$. Restul sîngelui s-a pus la incubat. Incubarea s-a făcut în cupe Warburg, la temperatura de 37 ± 0,02°C, sub agitare continuă (80 de oscilații pe minut). Din fiecare sistem s-au scos probe după 60 și 120 minute de incubare.

Din fiecare probă — după determinarea hematocritului — eritrocitele s-au izolat imediat de plasmă prin centrifugare la 2 000 ture/min timp de 10 min. În plasmă s-a determinat: (a) concentrația fosforului mineral prin metoda Bell, Doisy și Briggs [3], și (b) radioactivitatea, cu ajutorul unui contor Geiger-Müller cu fereastră frontală de mică, tip Vakutronik VA—Z—320. Aceste date au servit la studiul transferului fosforului în sistemul bicompartimental plasmă-eritrocite.

Sedimentul de eritrocite obținut din probele de sînge incubate a fost spălat de 3 ori cu soluție salină izotonică, tamponată la pH 7,3,

*) Considerațiile clinice și fiziopatologi ceasupra acestor cazuri constituie subiectul unei alte lucrări [2].

**) Formula soluției stabilizatoare nr. 7 folosită la conservarea sîngelui:

citrat trisodic	30 g
acid clorhidric normal	102 ml
glucoză	30 g
rivanol	0,03 g
apă bidistilată la	1 000 ml

în prealabil răcită la +4°C. După a treia spălare, lichidul supernatant nu mai prezenta radioactivitate semnificativă în raport cu fondul. S-a preparat apoi un extras celular cu acid tricloracetic 100%, răcit la +4°C (0,2 ml soluție de acid tricloracetic 100% pentru 1 ml de sediment de eritrocite spălate).

Extrasul acido-solubil din probele prelevate după 60 și 120 min de incubare a fost supus unei cromatografii unidimensionale ascendente pe hîrtie Whatman nr. 1. Sistemul de solvenți folosit a fost cel recomandat de P. Cerletti [4]: N-propanol, apă, acid tricloracetic 100%, amoniac 22°Bé (75 :20 :5 :0,3 în volume). Pe fiecare bandă s-a pipetat 0,1 ml extras, iar migrarea a durat 24 de ore.

Individualizarea diferitelor fracțiuni izolate prin cromatografie s-a făcut în raport cu profilul radiocromatografic. Acesta a fost stabilit prin determinarea discontinuă, din 5 în 5 mm, a radioactivității de-a lungul cromatogramei, cu ajutorul unui contor Geiger-Müller cu fereastră frontală de mică, tip Vakutronik VA—Z—320 și a instalației de numărare Vakutronik VA—G—20. Între fereastra contorului și cromatogramă s-a așezat un ecran de plexiglas de 10 mm grosime, prevăzut cu o fantă de 5 mm. Avansul benzii s-a făcut manual. În felul acesta au fost individualizate 5 fracțiuni, corespunzătoare la 5 maxime de activitate.

Benzile de cromatografie au fost tăiate în fragmente pe liniile corespunzătoare punctelor de minim ale profilului de radioactivitate. Fiecare fragment a fost mineralizat timp de 60 min pe baie de nisip cu cîte 1 ml acid percloric 72%, la care s-au adăugat cîte 2—3 picături de acid azotic fumans. Fosforul din fiecare fracțiune a fost dozat apoi după J. Berenblum și E. Chain [5]. În vederea corecției s-a făcut o probă oarbă care s-a lucrat în aceleași condiții.

Pentru precizarea compușilor existenți în fiecare din cele 5 fracțiuni izolate, o cromatogramă martor a fost fragmentată în același mod cu cel descris mai sus. Fragmentele au fost apoi eluate în cîte 4 ml apă distilată. S-a determinat la spectrofotometrul Beckman DU densitatea optică a fiecărei fracțiuni la 265 mμ.

REZULTATE

În raport cu obiectivele lucrării, rezultatele sînt prezentate în 2 grupe.

Transferul fosforului în sistemul bicompartimental plasmă-eritrocite

Tabela 1 cuprinde concentrațiile fosforului anorganic (P_i) din plasmă la timpul $t = 0$, după 60 și 120 min., exprimate în grame pe ml, precum și modificările lor procentuale în raport cu t_0 considerat egal cu 100.

În 5 din cele 6 sisteme incubate în condițiile descrise, concentrația fosforului mineral prezintă o creștere, după 120 de min, după ce într-o primă perioadă a prezentat o scădere de intensitate variabilă. Această

creștere finală a fosforului total anorganic din plasmă reprezintă *o difuziune a fosforului din interiorul eritrocitului spre plasmă.* Modificările procentuale cele mai mari au fost prezentate de sistemul conținînd eritrocitele bolnavului St. C.

Modificările concentrației fosforului mineral din plasmă nu pot fi atribuite unor modificări ale volumului relativ al plasmei în sistemele

Tabela 1

Modificările concentrației fosforului anorganic (P_i) din plasmă în decursul incubării

Proba analizată	Concentrația fosforului anorganic la timpul (min)					
	0		60		120	
	g (x)	%	g	%	g	%
Martor 1	1,14(.)	100	1,82	159	4,03	353
Martor 2	4,15	100	4,15	100	4,42	106
Martor 3	7,22	100	6,26	86,7	7,90	109,2
Martor 4	7,62	100	6,13	80,40	7,77	101,9
St. C.	2,77	100	1,68	60,0	6,06	218
Pr. D.	3,87	100	3,73	96	5,92	152

*) $n \times 10^{-5}$ g P_i/ml; (.) concentrațiile fosforului mineral (P_i) din plasmă la $t = 0$ nu prezintă aceleași valori în toate sistemele studiate, fapt care se datorește și cantității variabile de purtător din soluția de trasor adăugată.

respective. Determinările hematocritului, făcute în fiecare probă, arată o creștere relativă a volumului plasmatic în decursul incubării, care, în lipsa oricărui fenomen de transfer, ar duce la scăderea concentrației fosforului prin diluție.

În tabela 2 sînt cuprinse modificările relative ale activității plasmei în decursul incubării, în raport cu activitatea la timpul $t = 0$, considerată egală cu 100.

Tabela 2

Modificările procentuale ale activității fosforului radioactiv din plasmă în decursul incubării

Proba analizată	Activitatea relativă a fosforului radioactiv la timpul (min)		
	0	60	12
Martor 1	100	94,87	83,76
Martor 2	100	94,57	93,89
Martor 3	100	61,49	54,82
Martor 4	100	68,15	60,11
St. C.	100	108,88	111,32
Pr. D.	100	94,56	92,18

În decursul incubării se constată o scădere a radioactivității plasmei în toate probele examinate, cu excepția probei provenind de la bolnavul St. C. Aceste modificări ale activității plasmei *corespund unei pătrunderi a fosforului din plasmă în eritrocite.*

În cazul bolnavului St. C. radioactivitatea plasmei creşte în raport cu valoarea „inițială" şi se menține apoi aproximativ constantă. Particularitatea acestui tip de modificări, aparent paradoxal, nu poate fi explicată decît dacă se ia în considerație faptul că valoarea „inițială" nu corespunde riguros timpului $t = 0$. Între momentul adăugării trasorului în sistemul experimental şi cel al separării globulelor de plasmă (omogenizare, centrifugare, decantare etc.) a existat mereu un interval de aproximativ 10—15 min, în care procesele metabolice intracelulare nu au putut fi oprite în întregime. Noi considerăm că, deşi prelucrate în exact aceleaşi condiții ca şi celelalte trei sisteme experimentale, eritrocitele cazului St. C. au putut incorpora în acest răstimp scurt o cantitate relativ mare de fosfor radioactiv [6]. Această incorporare deosebit de rapidă a fosforului în eritrocitele bolnavului St. C. a fost confirmată de radiocromatograma extractului acido-solubil din eritrocitele probei „inițiale", în care fosforul prezenta o activitate specifică globală de 2,82 de ori mai mare decît aceea a fosforului din extractul obținut din eritrocitele martorului respectiv, precum şi de datele din tabela 1. Într-adevăr, numai în cazul St. C. a fost constatată o scădere importantă a fosforului total din plasmă în decursul primelor 60 min de incubare.

Repartizarea trasorului între fracțiunile acido-solubile intra-eritrocitare

În figura 1 este reprodus un profil radiocromatografic tipic pe care au fost suprapuse, sub formă de histogramă, nivelele fosforului din diferitele fracțiuni.

După cum reiese din figură, profilul radiocromatografic pune în evidență — prin punctele de maximă — existența a cinci fracțiuni distincte. Pe unele radiocromatograme, fracțiunile 1 şi 2 nu au apărut perfect individualizate prin punct de minimă; în aceste cazuri, separarea lor (pentru dozarea fosforului mineral) s-a făcut prin secționarea benzii la nivelul corespunzător limitei bine precizate pe alte benzi, cromatografiate în condiții identice.

Cele 5 fracțiuni radiocromatografice astfel separate nu le putem considera corespunzătoare la numai 5 compuşi chimic puri. Într-adevăr, în extractul acid din critrocite există cu siguranță un număr mai mare de compuşi fosforați, distribuiți de-a lungul benzii cromatografice. Criteriul de diferențiere a fracțiunilor, maximul de activitate, pune însă în evidență numai compuşii fosforați cu cea mai mare viteză de reînnoire, deci cu cea mai mare importanță metabolică. Ceilalți compuşi nu pot fi detectați după acest criteriu. Teoretic ei pot fi însă localizați atît în zona maximelor, cît şi în afara lor.

Metoda de separare cromatografică utilizată a dat, la standardizarea ei inițială de către P. Cerletti [4], următoarea succesiune de migrare a componenților dintr-un *amestec artificial de compuşi chimic puri* : ATP < IDP < ADP < PP < AMP < adenozină < adenină < P_i*). Dintre

*) Semnificația prescurtărilor utilizate în text : ATP = adenozintrifosfat ; IDP = = inozindifosfat ; ADP = adenozindifosfat ; PP = pirofosfat ; ADP = adenozinmonofosfat ; P_i = fosfor anorganic.

aceşti compuşi, doi au o importanţă metabolică deosebită şi pot fi localizaţi cu certitudine, în condiţiile noastre de lucru, după valoarea R_f: cel cu viteza cea mai mică de migrare, adenozintrifosfatul, în primul

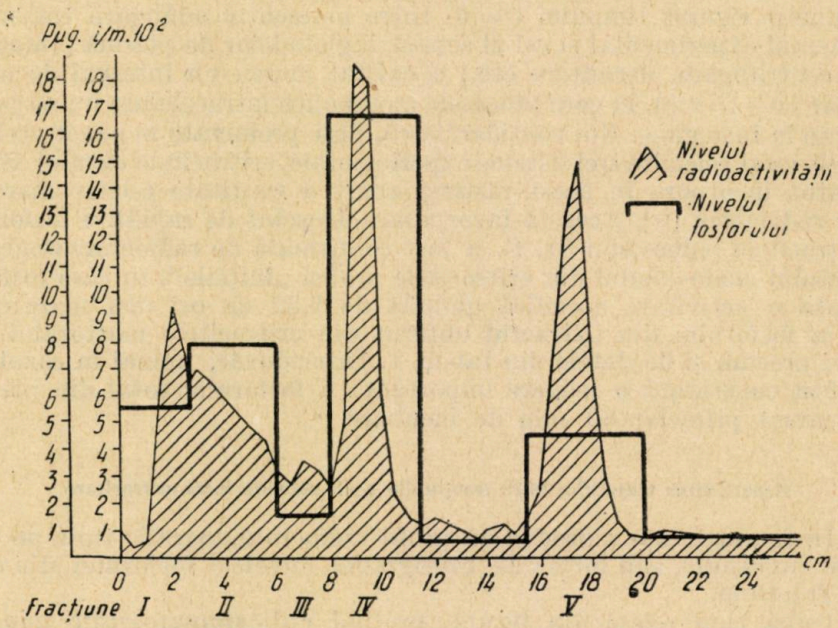


Fig. 1. — Repartizarea activităţii trasorului (^{32}P) şi a concentraţiei fosforului de-a lungul cromatogramei pe hîrtie.

Abscisă: distanţa de migrare în cm; ordonată: scara 1 = concentraţia fosforului (1×10^{-4} g/fracţiune); scara 2 = activitate în imp./min.

maxim de radioactivitate, iar cel cu viteza cea mai mare, fosforul anorganic (P_i), în respectiv ultimul maxim.

La precizarea compoziţiei celorlalte trei fracţiuni radiocromatografice s-au avut în vedere, în afară de datele lui P. Cerletti, şi rezultatele analizelor radiocromatografice ale *extractelor acidosolubile din eritrocite* publicate de T. A. J. Prankerd [7] şi E. Gerlach [8]. În fracţiunea a doua am considerat că se află adenozindifosfat şi cantităţi neglijabile de IDP (care se găseşte în cantităţi foarte mici în eritrocite). Fracţiunea a treia corespunde, în raport cu valoarea R_f stabilită de Cerletti [4], la AMP. Din cauza vitezei sale de refacere scăzută, acest compus nu poate fi însă identificat printr-un maxim de activitate; maximul care a precizat fracţiunea a treia este dat, foarte probabil, de diferiţi metaboliţi fosforaţi ai glucozei cum ar fi: fructozo-1,6-difosfatul, glucozo-6-fosfatul, aldehida fosfoglicerică, a căror viteză de refacere este mare [9]. Fracţiunea a patra considerăm că este formată cu precădere din 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG), deoarece este fracţiunea cu cel mai mare conţinut în fosfor, aşa cum apare evident pe histograma de pe figura 1. Există unanimitate de păreri între

autori asupra faptului că 2,3-difosfogliceratul conține singur pete 50 la sută din cantitatea de fosfor organic din eritrocite [10].

Considerațiile de mai sus sînt sprijinite și de rezultatele determinărilor densității optice la 265 mμ a celor cinci fracțiuni, care au fost obținute prin eluție de pe o cromatogramă martor. Densitatea minimă a fost găsită la nivelul fracțiunii a patra, dovedind conținutul ei redus în baze purinice și pirimidinice. Un argument în plus în sprijinul acestui punct de vedere este constituit de constatarea unei viteze de reînnoire redusă la radiofosforul din această fracțiune (tabela 4).

Nu am considerat necesar să mergem mai departe pe linia identificării componenților fosforați marcați cu ajutorul trasorului, întrucît pentru precizarea obiectivului urmărit erau suficiente datele asupra fracțiunii 1 (ATP) și asupra fracțiunii 5 (P_i).

În tabela 3 sînt reprezentate modificările repartiției fosforului acido-solubil intra-eritrocitar în decursul incubației.

Tabela 3

Modificările repartiției fosforului acido-solubil intra-eritrocitar în decursul incubației

Proba analizată	*t* min	1×10^{-6} g P/ml eritrocite *)					
		Numărul fracțiunii					Total
		1	2	3	4	5	
Martor 1	0	109,8		10,3	205	48,9	373,2
	60	147,1		12,0	204,8	73,2	437,1
	120	119,6		22,8	180,1	117,6	440,1
Martor 2	0	—		—	—	—	
	60	106,4	22,8	3,1	128,2	47,2	307,7
	120	75,2	74,7	11,4	196,8	66,0	424,1
Martor 3	0	142,8	—	—	259,5	87,9	—
	60	132,3	—	—	257,6	143,2	—
	120	113,1	—	—	233,6	158,4	—
Martor 4	0	94,4	—	—	278,2	73,2	—
	60	84,7	—	—	263,7	125,1	—
	120	109,0	—	—	222,2	164,1	—
St. C.	0	55,5	34,3	3,72	180,7	14,2	288,4
	60	63,9	44,6	2,24	205,6	48,9	385,4
	120	67,5	95,6	1,92	201,4	55,2	438,9
Pr. D.	0	—	—	—	—	—	—
	60	89,8	37,2	9,3	180,1	51,4	367,8
	120	102,2	27,8	10,0	169,8	53,5	363,3

*) Aceste cifre au fost corectate în raport cu diluția suferită prin extracția sedimentului de eritrocite cu soluția 100% de acid tricloracetic.

Prima constatare care se desprinde din analiza acestor date este o creștere continuă a cantității totale de fosfor acido-solubil intraeritrocitar în decursul incubării. Această creștere nu poate fi datorită decît *intrării în celulă a fosforului din mediul extracelular*. La prima vedere pare destul de greu de pus în legătură această constatare cu rezultatele

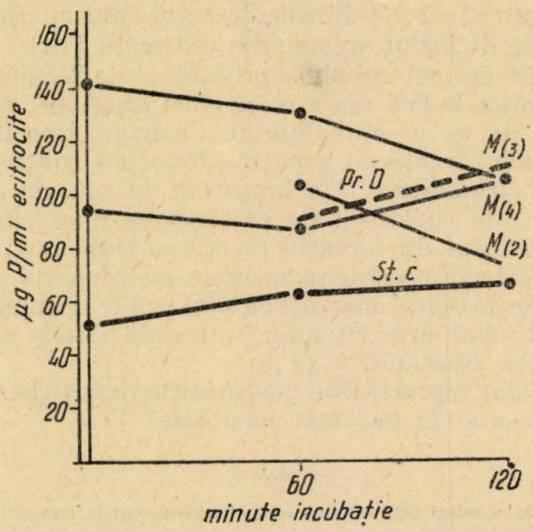


Fig. 2. — Modificările concentrației fosforului în fracțiunea 1 (ATP) în decursul incubației.

Tabela 4

Modificările repartizării procentuale a activităților specifice între fracțiunile fosforice acido-solubile intra-eritrocitare în decursul incubației

Proba analizată	*t* min	Activitatea specifică relativă (A.S.R.) imp. × min^{-1} × n.10^{-6} g^{-1} P (fracțiune) / imp. × min^{-1} × n.10^{-6} g^{-1} P (total acido-solubil intra-eritr.) — Numărul fracțiunii				
		1	2	3	4	5
Martor 1	0	33,960		0	0	66,040
	60	19,786		49,010	4,205	26,990
	120	35,529		25,999	11,901	26,570
Martor 2	0	—	—	—	—	—
	60	9,789	7,045	42,506	2,418	38,239
	120	21,390	4,417	22,872	3,209	48,100
Martor 3	0	26,90	0	0	0	73,990
	60	25,406	17,905	8,917	5,944	41,820
	120	21,607	20,930	12,760	9,723	34,970
Martor 4	0	29,910	23,070	0	0	47,000
	60	31,945	14,183	7,091	4,944	41,835
	120	23,466	15,834	11,269	10,770	38,659
St. C.	0	13,777	8,888	0	0	77,330
	60	19,359	17,926	26,341	4,664	31,700
	120	14,088	14,667	25,410	10,003	35,830
Pr. D.	0	—	—	—	—	—
	60	22,880	10,454	28,080	4,316	34,250
	120	21,400	12,650	29,120	6,686	30,130

determinărilor de fosfor mineral din plasmă, care arată că și în mediul extracelular concentrația fosforului crește după 120 min de incubație (tabela 1). Această din urmă creștere este însă de *un ordin de mărime* (*de zece ori*) *mai mic decît aceea a fosforului acido-solubil intra-eritrocitar*. Proveniența fosforului mineral care apare în plasmă nu ne este evidentă pentru moment. Ea s-ar putea explica eventual admițîndu-se că fosforul mineral care apare în plasmă nu provine din fracțiunea acido-solubilă din interiorul eritrocitului, ci din fracțiunea acido-insolubilă (fosfoproteine, fosfolipide etc.). Această concluzie este impusă de faptul că suma cantităților de fosfor acido-solubil din plasmă și din interiorul eritrocitelor suferă o creștere în decursul incubației. Este foarte probabil că compușii fosforați acido-insolubili suferă în decursul incubării o descompunere parțială cu eliberare de fosfor mineral (atît către interiorul, cît și spre exteriorul celulei), descompunere care poate fi atribuită fie unei labilități anormale a lor, fie unor activități litice anormal crescute în plasmă.

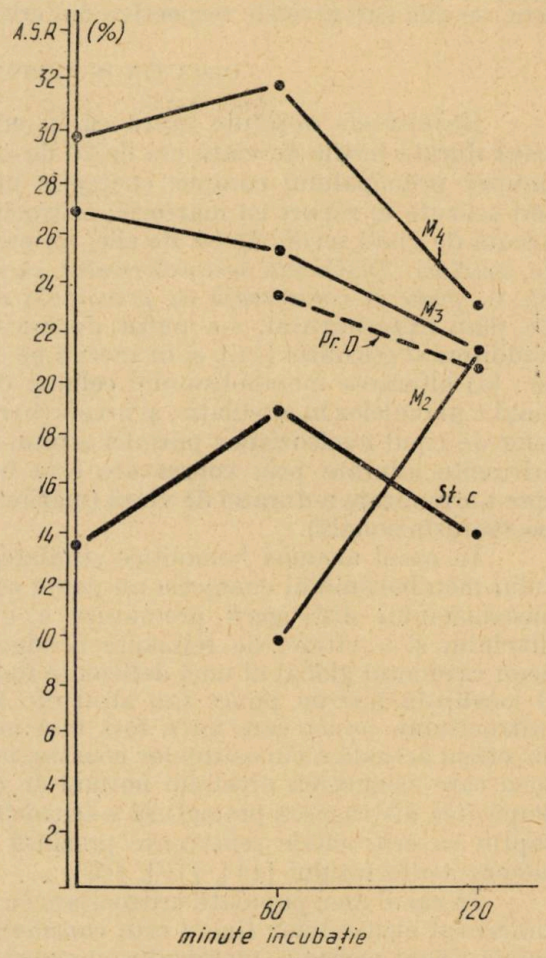


Fig. 3. — Modificările activității specifice relative (A.S.R.) a fracțiunii 1 (ATP) în decursul incubației.

A doua constatare care reiese din datele experimentale din tabela 3 este că eritrocitele bolnavului St. C. prezintă cel mai scăzut nivel de fosfor în fracțiunea 1, care corespunde adenozintrifosfatului; nici după 120 min de incubație fosforul din această fracțiune nu ajunge la nivelul pe care el îl are în eritrocitele normale martor (figura 2).

În tabela 4 sînt prezentate modificările în decursul incubației ale repartizării procentuale a activităților specifice între fracțiunile fosforice acido-solubile intra-eritrocitare (respectiv modificările activităților specifice relative), iar în figura 3 sînt prezentate modificările respective ale

activităţilor specifice relative ale fracţiunii 1, corespunzătoare adenozintrifosfatului. Din aceste date reiese că în eritrocitele bolnavului St. C. nivelele activităţilor specifice relative ale fosforului din adenozintrifosfat, compus care prezintă interes pentru urmărirea proceselor energetice celulare, se află sub nivelele respective din eritrocitele martore.

DISCUŢIA REZULTATELOR

Rezultatele obţinute arată că în eritrocitele bolnavului St. C., a căror durată medie de viaţă era de 20 de zile, atît cantitatea cît şi viteza sintezei principalului compus energetic intracelular, adenozintrifosfatul, sînt scăzute în raport cu martorii; eritrocitele bolnavului Pr. D., avînd o durată de viaţă medie de 80 de zile, nu prezintă diferenţe apreciabile faţă de martori. *Deficienţa metabolismului energetic al eritrocitelor bolnavului St. C. poate fi considerată ca principala cauză a scăderii viabilităţii lor.* Pe plan experimental, s-a putut demonstra pe eritrocite intoxicate cu inhibitori ai glicolizei [11], şi în special pe eritrocite conservate [12], [13], că: (a) alterarea metabolismului celular duce la o scurtare a duratei de viaţă a globulelor în circulaţie, şi invers (b) restabilirea cu ajutorul adjuvantelor de tipul nucleozizilor purinici a unui metabolism aproape normal în eritrocite alterate prin conservare este însoţită de o marcată tendinţă spre normalizare a duratei de viaţă (mărirea coeficientului de supravieţuire posttransfuzională).

În cazul anemiei hemolitice studiate, punerea în evidenţă a deficitului metabolismului energetic nu poate constitui o explicaţie completă a mecanismului distrugerii premature a globulelor respective; scăderea nivelului şi a vitezei de reînnoire a adenozintrifosfatului nu reprezintă decît răsunetul global al unei deficienţe funcţionale enzimatice, care poate fi localizată într-un punct sau altul din lanţul reacţiilor metabolice ale eritrocitului, punct care nu a fost însă individualizat. Pe de altă parte, în etapa actuală a cunoştinţelor noastre, nu este încă precizat mecanismul prin care asigurarea nivelului normal de compuşi energetici intracelulari împiedică distrugerea prematură a eritrocitelor [1]. Este însă bine stabilit faptul că eritrocitele senescente prezintă o scădere treptată a nivelului adenozintrifosfatului [14], [15], [16].

În cazul unei populaţii eritrocitare cu o durată de viaţă de 20 de zile, procentul elementelor tinere este considerabil mărit. Într-o populaţie de celule tinere normale, metabolismul energetic este mai intens decît într-o populaţie celulară obişnuită. Eritrocitele bolnavului St. C., deşi în majoritatea lor sînt tinere, prezintă dimpotrivă o scădere a metabolismului lor energetic, care subliniază *caracterul lor patologic.* Singura dovadă a tinereţei acestei populaţii celulare este reprezentată de incorporarea extrem de rapidă a fosforului din plasmă în interiorul eritrocitelor, care nu este însă însoţită de o înglobare corespunzătoare a trasorului în compuşii macroergici.

Prezentată la redacţie la 28 august 1962

Laboratorul de biochimie şi izotopi radioactivi,
Centrul de hematologie, Bucureşti

БИОХИМИЧЕСКОЕ ЭРИТРОЦИТНОЕ ПОРАЖЕНИЕ, ВЫЯВЛЕННОЕ ПРИ ПОМОЩИ РАДИОАКТИВНОГО ФОСФОРА

РЕЗЮМЕ

В работе описывается радиохроматографическая техника, примененная для исследования содержания и скорости восстановления внутриэритроцитного аденозинтрифосфата, после инкубации крови радиоактивным фосфором (^{32}P), в присутствии глюкозы. Исследование, произведенное на четырех контрольных особях и на двух больных гемолитической анемией, показало, что уменьшение продолжительности существования гематии соответствует в биохимическом отношении снижению содержания и скорости восстановления аденозинтрифосфата.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Распределение активности радиоактивного индикатора (^{32}P) и концентрации фосфора вдоль хроматограммы на бумаге. Абсцисса : расстояние миграции в см. Ордината : шкала 1 = концентрация фосфора (1×10^{-6} г/фракция); шкала 2 × активность в имп/мин.

Рис. 2. — Изменения концентрации фосфора в первой фракции (АТФ) во время инкубации.

Рис. 3. — Изменения относительной специфической активности (ОСА) первой фракции (АТФ) во время инкубации.

LÉSION ÉRYTHROCYTAIRE BIOCHIMIQUE MISE EN ÉVIDENCE À L'AIDE DU PHOSPHORE RADIOACTIF

RÉSUMÉ

On décrit la technique radiochromatographique utilisée pour étudier le niveau et la vitesse de renouvellement de l'adénosinetriphosphate intra-érythrocytaire, après incubation du sang au phosphore radioactif (^{32}P) en présence du glucose. L'étude effectuée sur 4 témoins et 2 malades d'anémie hémolytique a montré que la diminution de la durée de la vie des hématies correspond biochimiquement à une diminution du niveau et de la vitesse de renouvellement de l'adénosinetriphosphate.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Répartition de l'activité du traceur (^{32}P) et de la concentration du phosphore le long du chromatogramme sur papier. Abscisse : distance de migration, en cm ; ordonnée : échelle 1 = concentration du phosphore (1×10^{-6} g/fraction) ; échelle 2 = activité, en imp./min.

Fig. 2. — Modifications de la concentration du phosphore dans la fraction 1 (ATP) au cours de l'incubation.

Fig. 3. — Modifications de l'activité spécifique rélative (ASR) de la fraction 1 (ATP) au cours de l'incubation.

BIBLIOGRAFIE

1. P. TEITEL, *Contribuţii la studiul hemolizei normale şi patologice.* Dizertaţie pentru obţinerea titlului de candidat în ştiinţe medicale, I.M.F., Bucureşti, 15 noiembrie, 1961.
2. C. T. NICOLAU, P. TEITEL, G. TURCU, V. BRATU, *Aspects cliniques et métaboliques de certaines formes d'anémie hémolytique constitutionnelle.* Conférence scientifique organisée par l'Institut d'Hématologie et de Transfusion de Prague à l'occasion de son X-éme anniversaire, conjointement avec la Section d'Hématologie de la Société de Médecine Czechoslovaque J. E. Purkyňe, Prague, 25 mai, 1962.
3. P. GEORGESCU, E. PĂUNESCU, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Bucureşti, Ed. medicală, 1960, p. 146.
4. P. CERLETTI, N. SILIPRANDI, *Separatione cromatografica dell'ATP e dei suoi derivati organici ed inorganici.* La Ricerca Scientifica, **25**/7, 2084 (1955).
5. J. BERENBLUM, E. CHAIN, *An improved method for the colorimetric determination of phosphate.* Biochem. J., **32**, 295 (1938).
6. M. TATIBANA, K. MIYAMOTO, T. ODAKA, M. NAKAO, *Phosphorus metabolism in human erythrocytes. V. Incorporation of P^{32} during very short time intervals.* The Journal of Biochemistry (Japan), **48**/5, 685 (1960).
7. T. A. J. PRANKERD, K. I. ALTMAN, *A Study of Metabolism of Phosphorus in Mammalian Red Cells.* Biochem. J., **58**/4, 622 (1954).
8. E. GERLACH, A. FLECKENSTEIN, E. GROSS, *Der intermediäre Phosphatstoffwechsel des Menschen Erythrocyten.* Pflügers Arch., **266**, 528 (1958).
9. H. GREILING, W. WINKELMAN, E. SCHÜTTE, *Einfluss von Thiamin auf die Phosphataufnahme und den Phosphatstoffwechsel des Erythrozyten.* Acta Biol. Med. Germ., **1**/4, 389 (1958).
10. T. A. J. PRANKERD, *The Red Cell; an Account of its Chemical Physiology and Pathology* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960.
11. T. A. J. PRANKERD, *Viability and Survival of Red Cells.* Lectures on the Scientific Basis of Medicine, **VIII**, 269 (1958–59).
12. K. NAKAO, T. WADA, T. KAMIYAMA, *A Direct Relationship between Adenosine Triphosphate Level and in vivo Viability of Erythrocytes.* Nature (London), **194**/4831, 877 (1962).
13. B. W. GABRIO, C. A. FINCH, F. M. HUENNEKENS, *Erythrocyte preservation; a Topic of Molecular Biochemistry.* Blood, **11**, 103 (1956).
14. G. W. LÖHR, H. D. WALLER, O. KARGES, B. SCHLEGEL, A. A. MÜLLER, *Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten.* Klin. Wschr., *21*, 1008 (1958).
15. T. A. J. PRANKERD, *The Ageing of Red Cells.* J. Physiol. (London), **143**, 325 (1958).
16. P. A. MARKS, *Aspects biochimiques du vieillissement du globule rouge et de l'anémie hémolytique d'origine médicamenteuse.* N. Rev. Franç. Hémat., **1**/6, 900 (1961).

DETERMINAREA FOSFATAZEI ALCALINE PRIN METODA ELECTROMETRICĂ

DE

ACADEMICIAN I. NIŢULESCU şi L. ENESCU

Într-o notă anterioară [1] am prezentat rezultatele obţinute de noi în studiul variaţiilor acetilcolinesterazei sîngelui la pelagroşi, folosind metoda electrometrică propusă de I. Delaunois şi A. Cassier (2) pentru dozarea acestui ferment.

Apreciind avantajele metodei, ne-am gîndit că ea ar putea fi utilizată cu folos şi pentru dozarea altor esteraze al căror studiu prezintă interes clinic, în special al fosfatazei alcaline serice, care suferă variaţii semnificative în o serie de sindroame cum sînt: boala lui Paget, boala lui Albers-Schonberg, rahitismul [3], osteomalacia, boala lui Recklinghausen, icterul prin obstrucţie etc.

Cercetările pe care le prezentăm în această notă ne permit să concludem că, în adevăr, dozarea electrometrică folosind un electrod de antimoniu, după metoda propusă de Delaunois şi Cassier, poate fi utilă şi pentru determinarea fosfatazei alcaline.

Dispozitivul de lucru a rămas cel descris în notele noastre anterioare [4], [1]. El poate fi reprezentat prin schema de la p. 110.

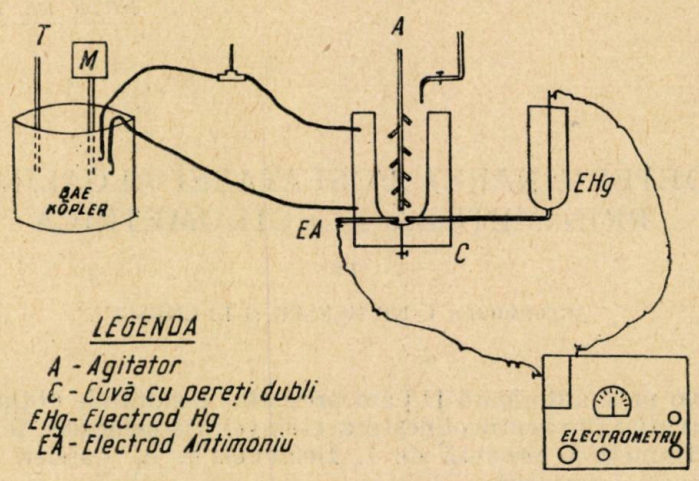
Ca substrat pentru măsurarea activităţii fosfatazice am folosit β-glicerofosfatul de natriu ($Na_2PO_4C_3H_7O_2$) cu greutatea moleculară 216.

Hidroliza provocată de fosfatază eliberează progresiv un număr de ioni de fosfat şi, corespunzător, de ioni de hidrogen, care modifică pH-ul mediului şi, prin aceasta, determină devierea respectivă a acului galvanometrului din dispozitivul electrometric. Echilibrul ionic poate fi însă restabilit dacă neutralizăm ionii eliberaţi printr-o soluţie titrată de NaOH.

Mersul hidrolizei poate fi deci măsurat prin cantitatea de NaOH utilizată ca să corectăm variaţiile aciditătii şi să menţinem sistematic pH-ul iniţial. Deoarece optimul de activitate al fosfatazei alcaline este la pH 9,2, determinarea începe prin stabilirea acestui pH în mediul de dozare şi continuă prin menţinerea lui în tot timpul cercetării.

În experiențele noastre am folosit tehnica următoare : se introduc în cuvele aparatului [4] 10 ml apă bidistilată, 0,25 ml ser sangvin și 0,5 ml soluție de β-glicerofosfat de sodiu 2,5 %, corespunzător la 1,73 mg fosfor.

Reacția mediului e adusă la pH 9,2 prin titrare cu o soluție de NaOH 0,005 N și cu ajutorul dispozitivului electrometric, astfel ca acul galvanometrului să se găsească la acest pH în dreptul punctului 0 al scalei.



Schema dispozitivului de dozare electrometrică.

Lăsăm acum să cadă din biuretă un mic exces de NaOH, care provoacă o deviere a acului galvanometric spre stînga. Procesul hidrolizei, liberînd ioni de hidrogen, neutralizează treptat acest exces, ceea ce face ca acul galvanometrului să vină din nou încet spre 0. Dacă la intervale anumite, spre exemplu la fiecare 15 min, adăugăm cîte un exces de soluție alcalină, putem urmări și neutraliza sistematic ionii acizi eliberați în acest timp.

Din numărul total de ml de soluție de NaOH utilizați într-un timp dat (de pildă 3 ore) putem deduce, prin calcul, cantitatea de glicerofosfat hidrolizată, socotind că 1 ml NaOH 0,005 N corespunde la 0,155 mg fosfor.

Experiențele de control, folosind un extract de cartilaj osos bogat în fosfataze alcaline, ne-au arătat că metoda electrometrică poate să dea rezultate satisfăcătoare, dacă se respectă următoarea precauție : este numaidecît necesar ca pe suprafața lichidului să se adauge un strat de oleu de vaselină neutru. Fără aceasta, soluția suferă o acidificare progresivă chiar în lipsa activității fosfatazice, probabil sub influența acidului carbonic atmosferic care pătrunde mereu în cuva de reacție, al cărei conținut este menținut în mișcare prin agitatorul electric.

Credem că această precauție este indispensabilă nu numai pentru dozarea fosfatazei, ci și pentru aceea a acetilcolinesterazei, precum și în cazul oricărei alte determinări în care se folosește metoda lui Delaunois și Cassier.

După cum se ştie, acidul fosforic e un acid tribazic şi are deci trei constante de disociere, din care a treia este destul de apropiată de pH-ul la care lucrăm [9], [2]. Pentru a neutraliza complet şi pe al treilea ion de hidrogen pe care-l poate elibera acidul fosforic, în titrarea finală adăugăm cantitatea necesară de soluţie NaOH pentru a aduce pH-ul la valoarea 11.

Tabela 1

Rezultatele comparative ale activităţii fosfatazice a unui extract de cartilaj osos, obţinute prin metoda electrometrică şi prin cea colorimetrică

Metoda	Cantitatea în P corespunzătoare glicerofosfatului hidrolizat (în mg)					
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV	Exp. V	Exp. VI
Dozaj electrometric	0,043	0,081	0,079	0,046	0,041	0,062
Dozaj colorimetric (Bodansky)	0,048	0,074	0,086	0,048	0,037	0,049
Diferenţa în procente în raport cu dozarea electrometrică	+11%	−9%	+10,9%	+10%	−9%	−7,9%

Tabela 2

Mersul unei determinări a activităţii fosfatazice a extractului de cartilaj osos

Timpul de activitate min	ml NaOH 0,005 N adăugaţi succesiv	Cantitatea totală de ml NaOH 0,005 N folosită pînă în momentul dat	Cantitatea de P eliberat mg
0	—	—	—
15	0,70	0,70	—
30	0,46	1,16	0,179
45	0,40	1,56	—
60	0,40	1,96	0,303
75	0,38	2,34	—
90	0,34	2,68	0,417
105	0,39	3,07	—
120	0,40	3,47	0,537
135	0,36	3,83	—
150	0,37	4,20	0,651
165	0,39	4,59	—
180	0,40	4,99	0,773

Pentru precizarea valorii practice a tehnicii propuse, am făcut o serie de determinări urmărind timp de 3 ore activitatea fosfatazică a extractului de cartilaj osos sau a serului sangvin, atît prin metoda electrometrică cît şi prin metoda colorimetrică a lui A. Bodansky [5].

Cîteva din rezultatele obţinute sînt date în tabelele 1, 2 şi 3.

Rezultatele obţinute ne permit să conchidem că metoda electrometrică poate fi utilizată practic pentru determinarea fosfatazelor serice.

Ea prezintă, credem, o serie de avantaje față de metodele colorimetrice curente.

În primul rînd permite urmărirea continuă a mersului în timp a hidrolizei, pe cînd metodele colorimetrice nu permit decît cunoașterea situației finale, după un anumit interval de timp (1—3 ore). Acest fapt

Tabela 3

Analiza electrometrică a serului de la două persoane normale și 14 bolnavi

Numele	Vîrsta luni	Diagnoza	mg P eliberat în 3 ore	Unități electrometrice de fosfatază*)
B.I.	14	rahitism, anemie	0,042	16,8
I.G.	11	rahitism	0,052	20,8
C.I.	14	rahitism	0,037	14,8
B.V.	9	rahitism	0,043	17,2
F.P.	9	rahitism	0,028	11,2
N.C.	9	rahitism	0,081	32,4
C.D.	11	rahitism, rinofaringită	0,079	31,6
S.C.	10	rahitism, otită	0,046	18,4
U.E.	10	rahitism, distrofie	0,068	27,2
C.E.	11	rahitism, rinofaringită	0,054	21,6
B.F.	15	rahitism	0,062	24,8
G.A.	13	rahitism, anemie	0,049	19,6
N.A.	13	osteomielită	0,092	36,8
M.I.	15	osteomielită	0,085	34,0
N.P.	12	normal	0,016	6,4
A.I.	11	normal	0,010	5,8

*) Prin unitate fosfatazică electrometrică propunem să se numească cantitatea de esterază capabilă de a hidroliza, în cuva electrometrică în timp de 3 ore, la pH 9,2, o cantitate de β-glicerofosfat de sodiu corespunzătoare la 1 mg P.

ar putea avea o deosebită importanță pentru studiul diferitelor afecțiuni studiate.

Pe de altă parte, trecînd peste unele greutăți tehnice — de altfel puțin cunoscute — care ar putea fi întîlnite la montarea și reglarea inițială a dispozitivului de lucru, o dată metoda pusă la punct, determinările se pot face cu destulă ușurință și simplitate, evitînd greutățile obiective și subiective inerente metodelor colorimetrice.

Trebuie să menționăm și faptul că determinările cer consumarea unei cantități foarte mici de glicerofosfat de sodiu, ceea ce ar putea constitui în unele împrejurări încă un avantaj.

CONCLUZII

Datele prezentate ne permit să conchidem că metoda electrometrică propusă de Delaunois și Cassier pentru dozarea electrometrică a acetilcolinesterazei poate fi utilizată cu folos și pentru dozarea fosfatazei alcaline.

Ea prezintă, față de metodele colorimetrice, avantajul unei tehnici obiective și, mai ales, posibilitatea urmăririi în timp a mersului hidrolizei și deci a construirii unei curbe de activitate a fermentului seric.

Determinările comparative făcute prin metoda colorimetrică a lui Bodansky și prin metoda electrometrică, folosind ca sursă de fosfatază un extract de cartilaj osos sau serul sangvin, provenit de la oameni normali sau bolnavi, cu fosfatazele serice crescute, ne-au arătat o corespondență satisfăcătoare și au evidențiat interesul utilizării metodei electrometrice în practica laboratoarelor clinice.

Prezentată la redacție la 1 septembrie 1962

Laboratorul de fiziopatologie
I.M.F., Iași

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

РЕЗЮМЕ

Авторы предлагают определять щелочную фосфатазу электрометрическим методом, примененным Делануа и Кассие для определения ацетилхолинэстеразы. Этот метод представляет преимущество абсолютно объективной техники и вместе с тем позволяет беспрерывно следить за эволюцией гидролиза и построить соответствующую кривую.

Определения, по сравнению с полученными методом Бодянского, при котором фосфатазу получали из экстракта костных хрящей или кровянсй сыворотки, взятых от здоровых или больных лиц, выявили ценность этого метода для клинических лабораторий.

DÉTERMINATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA MÉTHODE ÉLECTROMÉTRIQUE

RÉSUMÉ

On propose l'emploi de la méthode électrométrique pour le dosage de la phosphatase alcaline du sérum à l'aide d'un dispositif utilisant une électrode d'antimoine.

Le substratum employé est le β-glycérophosphate de sodium, le milieu de dosage est maintenu au pH 9,2 et la titration s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH n/200 pendant trois heures.

Les déterminations comparatives effectuées par la méthode colorimétrique de Bodansky et par la méthode électrométrique, en utilisant comme source de la phosphatase un extrait de cartilage osseux ou du sérum sanguin provenant d'hommes sains ou de malades ayant les phosphatases sériques augmentées, ont donné des résultats satisfaisants qui rendent intéressante l'application de la méthode électrométrique dans la pratique des laboratoires cliniques.

BIBLIOGRAFIE

1. I. NITULESCU, L. ENESCU, D. HERESCU, C. ZOSIN, *Asupra variațiilor acetilcolinesterazei sîngelui după administrarea de acid nicotinic la pelagroși.* Lucrările sesiunii generale științifice a Academiei R.P.R., 1950, p. 1926.
2. I. DELAUNOIS, A. CASSIER, Experientia, 2, 66 (1946).
3. E. SORU, *Biochimia medicală.* Ed. medicală, București, 1959, **1**, 668.
4. A. L. ENESCU, *Aparat pentru dozarea esterazelor.* Revista medico-chirurgicală Iași, **II**, 433 (1960).
5. V. E. PREDECENSKI, V. M. BOROVSCAIA, L. T. MARGOLINA, *Metode de laborator clinic.* Ed. medicală, București, 1953, 252.

NOTĂ DE LABORATOR

CONTRIBUȚII LA APLICAREA MICROMETODEI LOWRY ÎN CONDIȚIILE EVALUĂRII FRACȚIUNILOR PROTEICE ELUATE PRIN GRADIENT DE CONCENTRAȚIE DE CLORURĂ DE POTASIU

DE

M. ȘERBAN, D. TĂNĂSESCU și S. VASU

Printre metodele de determinare a proteinelor, micrometoda descrisă de O.H. Lowry și colaboratori [1], modificată ulterior de G.L. Miller [2], se remarcă ca una din cele mai adecvate și eficiente, datorită calităților esențiale pe care le întrunește : sensibilitate înaltă și posibilitatea efectuării analizelor în serie. Aceste calități conferă metodei o largăap licabilitate, înclusiv în domeniul stabilirii pe cale analitică a heterogenității compușilor proteici separați pe coloana cromatografică (DEAE-celuloză, carboxiceluloză, DEAE-sefadex etc.).

Lucrările în această direcție sînt de actualitate, iar capacitatea de rezoluție a unor astfel de suporturi de fracționare a compușilor proteici reclamă metode de determinare nu numai sensibile, dar în același timp și specifice. Analiza fracțiunilor proteice separate pe coloană, în vederea stabilirii și caracterizării diagramelor de fracționare, apelează exclusiv la metoda spectrofotometrică și la micrometoda de determinare a proteinelor, menționată mai sus. Considerăm însă că această metodă, deși nu poate fi comparată de exemplu, ca expeditivitate, cu cea spectrofotometrică, prezintă totuși în raport cu aceasta din urmă o specificitate care ar situa-o pe o poziție preferențială.

În legătură cu fracționarea pe coloană de DEAE-celuloză și caracterizarea proteinelor musculare sarcoplasmatice, precum și a unor enzime din mucegaiuri, în condițiile aplicării micrometodei Lowry modificate, noi am constatat un fapt experimental pe care ne-am propus să-l semnalăm și să-l explicăm în această notă. Semnalarea lui o găsim utilă, întrucît el afectează atît condițiile de determinare a eluatelor obținute sub un gradient de concentrație, cît și aplicabilitatea analitică a micrometodei, aceste două aspecte condiționîndu-se în ultima instanță. Atragem astfel

atenția asupra unor limite ce se impun la folosirea sărurilor de potasiu pentru eluția fracțiunilor proteice separate pe coloana de celuloză și, implicit, asupra interferenței ionului de potasiu cu reactivul fosfomolibdenowolframic, ceea ce, în acest caz, face inaplicabilă metoda Lowry (modificată). Autorii metodei inițiale au studiat influența diferiților compuși și a concentrației acestora asupra specificității reacției și domeniul ei de aplicabilitate analitică. În seria de compuși anorganici și organici luați în considerare de către autorii metodei nu figurează influența ionului de potasiu.

Noi am constatat că prezența potasiului în probele care conțin proteine și care urmează a fi evaluate prin micrometoda Lowry modificată determină, chiar în concentrații mici, apariția unei intense opalescențe, pînă la formarea de precipitat abundent, ceea ce face imposibilă determinarea colorimetrică a proteinelor. Dacă la aceasta se adaugă faptul că pentru realizarea gradientului de concentrație la eluția fracțiunilor proteice separate pe coloană clorura de potasiu se utilizează în concentrații cuprinse de exemplu între 0,1 M și 2 M [3] [4], și că clorura de potasiu este, în general, frecvent folosită la extracția proteinelor musculare, dificultatea produsă de ionul de potasiu în cazul aplicării micrometodei Lowry modificate apare evidentă.

În vederea stabilirii componentului chimic care determină apariția precipitatului în condițiile noastre de lucru, ne-am îndreptat atenția atît asupra reactivilor implicați în reacția de dozare a proteinelor (sulfatul de cupru, tartratul de potasiu, carbonatul de sodiu, hidroxidul de sodiu și complexul fosfomolibdenowolframic), cît și asupra celor folosiți la separarea proteinelor pe coloană (tampon Tris-acid clorhidric și clorură de potasiu, cu care se realiza un gradient de concentrație la pH constant). Determinările au stabilit că tamponul Tris nu are nici o influență asupra componenților reacției de determinare a proteinelor. În schimb, clorura de potasiu este aceea care, în prezența acestor componenți, provoacă apariția precipitatului. Procedînd prin eliminare, am stabilit că în reacția de precipitare sînt implicați clorura de potasiu și complexul fosfomolibdenowolframic, și că ea este favorizată numai de mediul alcalin în care are loc, de fapt, reacția de culoare ce stă la baza determinării proteinelor prin această micrometodă. Ceilalți componenți chimici, ca : sulfatul de cupru, carbonatul de sodiu și tartratul de potasiu (aflat în concentrație foarte mică) nu sînt implicați în reacția de precipitare.

Cu toate acestea, cercetînd influența clorurii de potasiu, am folosit totuși toți reactivii interesați în metoda Lowry modificată,pentru a ne încadra riguros în condițiile pe care le impune metoda. Pentru a stabili acțiunea ionului de potasiu în reacția de precipitare, s-au încercat o serie de săruri de potasiu, ca : clorura de potasiu, sulfatul de potasiu, bromatul de potasiu, bromura de potasiu , fosfatul monopotasic. În toate aceste cazuri s-a constatat apariția unui precipitat în prezența reactivilor utilizați în micrometoda menționată de dozare a proteinelor. Rezultă așadar că ionul de potasiu este acela care intervine specific în precipitare și că anionii nu au nici o influență în acest proces. Pentru comparație au fost încercate și o serie de săruri de sodiu, ca : clorura de sodiu, sulfatul

de sodiu, tetraboratul de sodiu, acetatul de sodiu, fosfatul de sodiu. În aceste cazuri nu s-a semnalat apariția precipitatului. Subliniem însă că dacă la reactivii de dozare a proteinelor după micrometoda Lowry modificată, în care se află deja ionul de sodiu, se adaugă și o sare de potasiu, se observă imediata precipitare, ceea ce subliniază încă o dată rolul potasiului în acest fenomen. Faptul menționat prezintă importanță, întrucît între clorura de potasiu și clorura de sodiu există o mare analogie chimică, ceea ce permite înlocuirea clorurii de potasiu cu clorura de sodiu.

Rezultatele bune obținute de noi prin folosirea clorurii de sodiu atît ca mediu de extracție (în tampon Tris-acid clorhidric) a proteinelor musculare sarcoplasmatice, cît și la realizarea gradientului de concentrație pentru eluarea fracțiunilor separate pe coloana de DEAE-celuloză, în condițiile aplicării micrometodei Lowry modificate, fac recomandabilă această înlocuire.

Precipitatul care se formează în condițiile descrise ia naștere, după cum am arătat, din interacțiunea ionilor de potasiu cu reactivul Folin. Pentru a stabili componenții reactivului Folin care, alături de ionul de potasiu, sînt implicați în formarea precipitatului, am urmărit în mod separat influența acestor componenți. În acest sens s-au utilizat următoarele soluții :

	Apariția precipitării
1. molibdat de sodiu	—
2. wolframat de sodiu	—
3. acid ortofosforic	—
4. molibdat de sodiu + wolframat de sodiu	—
5. molibdat de sodiu + acid ortofosforic	—
6. wolframat de sodiu + acid ortofosforic	∓
7. molibdat de sodiu + wolframat de sodiu + acid ortofosforic	+

Aceste soluții, la care s-a adăugat în proporția respectivă și acid clorhidric (conform metodei de preparare a reactivului Folin), au fost încălzite la fierbere și apoi răcite ; după alcalinizarea mediului cu hidroxid de sodiu, s-a adăugat la toate variantele soluție de clorură de potasiu de diferite concentrații, constatîndu-se apariția precipitatului în varianta 7 și o ușoară opalescență în varianta 6. Pe baza acestor observații s-a conchis că precipitarea se datorește complexului fosfomolibdenowolframic format la încălzire și că, de asemenea, fosfowolframatul ar avea în mod particular o anumită influență. Pentru verificarea datelor obținute pe această cale, s-a utilizat atît wolframatul de sodiu, cît și parawolframatul de sodiu ; rezultatele au fost identice în ambele cazuri.

Ca proprietăți, precipitatul obținut este fin, depunîndu-se ușor la centrifugare și destul de greu la sedimentare normală ; este foarte ușor solubil în mediu acid și, de asemenea, solubil în apă ; stabilitatea precipitatului este asigurată numai de mediul puternic alcalin.

Pentru precizarea mai exactă a rolului ionului de potasiu, precum și a condițiilor în care se produce precipitarea ne-am propus, în continuare, să stabilim următoarele două aspecte: a) concentrația limită a ionului potasiu, respectiv a clorurii de potasiu care determină precipitarea, și b) relația dintre concentrația proteică și apariția precipitatului. În acest scop, am efectuat o serie de determinări în care concentrația proteică s-a menținut constantă, variind concentrația în clorura

Tabela 1

Influența diferitelor concentrații de clorură de potasiu asupra precipitării la concentrație constantă de proteină (serum albumină bovină)

Nr. crt.	Soluție proteină μg/ml	Soluție KCl molaritate	Apariția precipitării	Nr. crt.	Soluție proteină μg/ml	Soluție KCl molaritate	Apariția precipitării
1	20	0,01	—	10	20	0,1	+
2	20	0,02	—	11	20	0,2	+
3	20	0,03	—	12	20	0,4	+
4	20	0,04	—	13	20	0,6	+
5	20	0,05	—	14	20	1,0	+
6	20	0,06	—	15	20	1,4	+
7	20	0,07	+	16	20	1,8	+
8	20	0,08	+	17	20	2,0	+
9	20	0,09	+	18	20	—	—

de potasiu, și o altă serie de determinări în care s-a variat concentrația proteică, menținîndu-se constantă concentrația limită în clorură de potasiu care determină precipitarea.

În primul caz, așa cum reiese din tabela 1, pentru o concentrație proteică (albumină serică bovină) constantă de 20 μg/ml, s-a folosit o scară de concentrație de clorură de potasiu cuprinsă între 0,01 și 2 M. Concentrația critică în clorură de potasiu, care determină apariția precipitatului, are o valoare destul de scăzută, de ordinul 0,07—0,08 M (aceeași valoare a fost găsită și confirmată și prin efectuarea determinărilor în care proteina era înlocuită cu apă). Determinările au fost efectuate la volum constant: 1 ml probă care a conținut volume variabile de soluție de proteină 200 μg/ml, clorură de potasiu și apă. Urmărindu-se în paralel valorile extincțiilor ($\lambda = 726$ mμ, $d = 1$ cm), se constată o tendință de scădere a acestora începînd de la aproximativ 1,0 M concentrație în clorură de potasiu, după cum se observă din figura 1. Totodată, din figura 2 rezultă că valoarea acestor extincții în intervalul 0,01—0,09 M clorură de potasiu este practic constantă.

În al doilea caz s-a variat concentrația proteică într-un domeniu cuprins între 10 μg—200 μg/ml, pentru anumite valori constante date concentrației de clorură de potasiu. În această situație, prezența clorurii de potasiu determină unele abateri față de curba etalon stabilită fără adaos de clorură de potasiu și luată ca sistem de referință. Comparînd curbele $\varepsilon = f(c)$ obținute în aceleași condiții, apare evident că aceste abateri sînt în funcție de concentrația clorurii de potasiu prezente. Din figura 3 reiese că la o concentrație constantă de clorură de potasiu egală

cu 0,05 M de exemplu, situată deci sub limita de precipitare, abaterea este mai mică decît în cazul folosirii unei concentrații constante de clorură de potasiu care determină însă precipitarea (0,1 M). În acest din

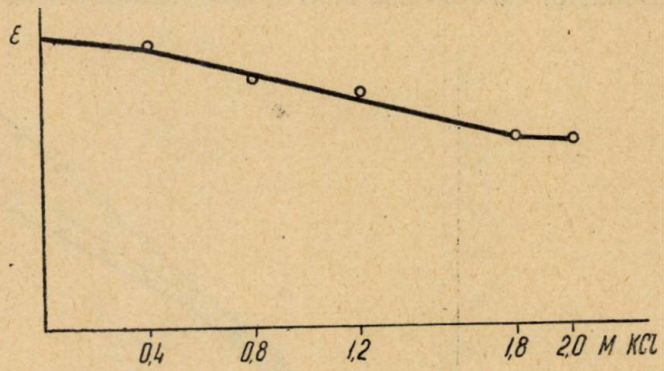


Fig. 1. — Influența clorurii de potasiu (0,1—2 M) asupra valorii extincțiilor la concentrație constantă de proteină (20 μg/ml).

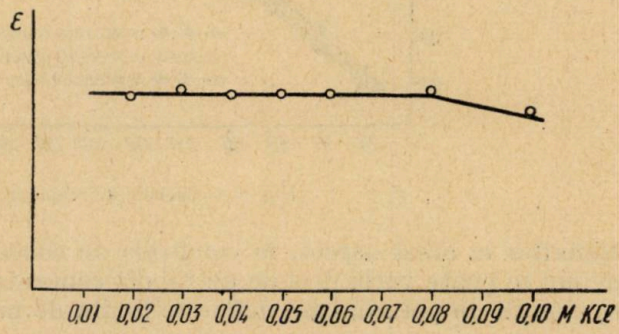


Fig. 2. — Influența clorurii de potasiu (0,01 — 0,09 M) asupra valorii extincțiilor la concentrație constantă de proteină (20 μg/ml).

urmă caz, valorile extincțiilor (determinate după îndepărtarea precipitatului) scad în special pentru valori mai mari ale concentrației proteice.

Experiențele efectuate cu concentrație variabilă de proteină, dar la concentrație constantă de clorură de potasiu, au scos în evidență și un alt fapt, și anume efectul „protector" al proteinei pentru un anumit interval de concentrație a acesteia. Astfel, la o concentrație constantă în clorură de potasiu, cu o valoare (0,06 M) inferioară celei care produce precipitarea, se constată că în timp ce în probele care conțin cantități variabile de proteină nu se observă opalescență sau precipitare, la proba martor în schimb apare fenomenul de precipitare (tabela 2). Acest efect „protector" al proteinei este evident și se confirmă dacă se experimentează chiar la concentrația critică de clorură de potasiu care determină apariția precipitării, și anume la 0,07 M. În acest caz, așa după cum reiese din tabela 3, precipitarea se produce numai în primele șase probe, adică într-un domeniu de concentrație proteică cuprins între 10 și 120 μg/ml, concentrație care nu poate împiedica procesul de precipitare. În proba martor, fără proteină, precipitarea devine mult mai intensă decît în proba similară din cazul citat anterior. De la 120 la 200 μg/ml proteină

se manifestă efectul „protector" al acesteia, care anihilează precipitarea. Totuși, acest efect este anihilat și el din moment ce se depășește concentrația critică a clorurii de potasiu care declanșează procesul de precipitare (influența valorilor mai mari de concentrație proteică nu a fost cercetată).

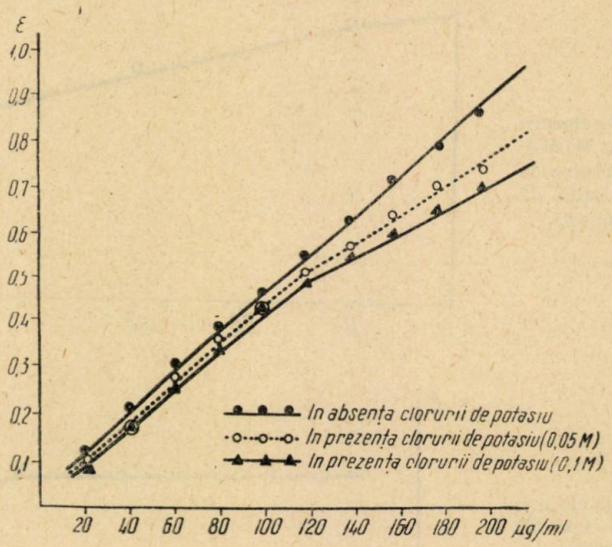


Fig. 3. — Curbele de etalonare.

Referitor la acest aspect, în condițiile de concentrație proteică cercetate de noi se poate vorbi deci de un raport concentrație proteică/concentrație în clorură de potasiu care definește limita de precipitare, respectiv limita

Tabela 2

Efectul diferitelor concentrații de proteină asupra precipitării (la o concentrație de clorură de potasiu sub limita celei care produce precipitarea)

Nr. crt.	Soluție proteică µg/ml	Soluție KCl molaritate	Apariția precipitării	Nr. crt.	Soluție proteică µg/ml	Soluție KCl molaritate	Apariția precipitării
1	20	0,06	—	7	140	0,06	—
2	40	0,06	—	8	160	0,06	—
3	60	0,06	—	9	180	0,06	—
4	80	0,06	—	10	200	0,06	—
5	100	0,06	—	11	—	0,06	+
6	120	0,06	—				

de aplicabilitate a metodei de determinare a proteinelor după micrometoda Lowry modificată. Acest raport desemnat cu aproximație 120 µg/ml proteină/0,07 M clorură de potasiu, are o valoare critică la care scăderea numărătorului sau creșterea numitorului determină fenomenul de precipitare.

Tabela 3

Efectul diferitelor concentrații de proteină asupra precipitării (la concentrație constantă de clorură de potasiu care determină precipitarea)

Nr. crt.	Soluție proteică µg/ml	Soluție KCl molaritate	Apariția precipitării	Nr. crt.	Soluție proteică µg/ml	Soluție KCl molaritate	Apariția precipitării
1	20	0,07	++	6	120	0,07	+
2	40	0,07	++	7	140	0,07	−
3	60	0,07	+	8	160	0,07	−
4	80	0,07	+	9	180	0,07	−
5	100	0,07	+	10	200	0,07	−
				11	−	0,07	+++

Materialul experimental prezentat permite deci conturarea următoarelor concluzii :

— ionul de potasiu, respectiv clorura de potasiu, (în concentrație $\geqslant$0,07 M) face inaplicabilă micrometoda de determinare a proteinelor după Lowry, modificată de Miller, prin formarea unui precipitat cu reactivul fosfomolibdenowolframic ;

— soluțiile de proteină, în prezența ionului de potasiu, exercită în anumite limite de concentrație un efect „protector" asupra apariției precipitării ;

— din motivele arătate, micrometoda Lowry, modificată de Miller, nu poate fi utilizată în cazul determinării fracțiunilor proteice eluate cu gradient de concentrație în săruri de potasiu, respectiv clorură de potasiu ; este recomandabilă folosirea sărurilor de sodiu, respectiv a clorurii de sodiu ; aplicarea acesteia la eluția proteinelor musculare sarcoplasmatice fracționate pe coloană de DEAE-celuloză și în condițiile determinării lor cu metoda Lowry modificată a dat rezultate corespunzătoare.

Prezentată la redacție la 10 noiembrie 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

К ВОПРОСУ О МИКРОМЕТОДЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПО ЛАУРИ (ИЗМЕНЕННОМ). ПРИМЕНЕНИЕ ЭТОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЮИРОВАННЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ЧЕРЕЗ ГРАДИЕНТ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИСТОГО КАЛИЯ

РЕЗЮМЕ

Ион калия и, соответственно, хлористый калий, начиная со сравнительно небольших концентраций, препятствуют применению метода определения белков по Лаури, измененного Миллером, из-за образо-

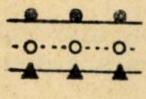
вания осадка с фосфо-молибденово-вольфрамовым реактивом. В присутствии иона калия этим методом можно пользоваться лишь весьма ограниченно. Он неприменим для определения белковых фракций элюированных с хроматографической колонки при градиенте концентрации хлористого калия (или же других калийных солей). Вместо этих солей рекомендуется применение натриевых, в частности хлористого натрия. Применение последнего для элюирования мышечных саркоплазматических белков, фракционированных на ДЕАЕ-целуллозе в условиях определения этих белковых фракций по измененному методу Лаури, дало соответствующие результаты.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Влияние хлористого калия (0,1—2 м) на значение экстинкции при постоянной концентрации белков (20 мг/мл).

Рис. 2. — Влияние хлористого калия (0,01—0,03 м) на значение экстинкции при постоянной концентрации белков (20 мг/мл).

Рис. 3. — Стандартные кривые :



при отсутствии хлористого калия;
в присутствии хлористого калия (0,05 м);
в присутствии хлористого калия (0,1 м).

CONTRIBUTION À L'APPLICATION DE LA MICROMÉTHODE DE LOWRY DANS LES CONDITIONS DE L'ÉVALUATION DES FRACTIONS PROTÉIQUES ÉLUÉES PAR GRADIENT DE CONCENTRATION DE CHLORURE DE POTASSIUM

RÉSUMÉ

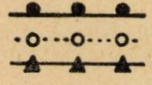
L'ion potassium, respectivement le chlorure de potassium, à partir de concentrations assez faibles, rend inapplicable la méthode de détermination des protéines d'après Lowry, modifiée par Miller à cause de la formation d'un précipité avec le réactif phosphomolybdotungstique. Cette méthode a un domaine d'applicabilité restreint en présence de l'ion potassium. Elle ne peut être employée pour la détermination des fractions protéiques éluées d'une colonne chromotographique à gradient de concentration de chlorure de potassium (ou d'autres sels de potassium). A la place de ces derniers il est recommandable d'utiliser des sels de sodium, respectivement le chlorure de sodium. L'application de celui-ci pour l'élution des protéines musculaires sarcoplasmatiques fractionnées sur DEAE-cellulose et dans les conditions de leur détermination par la méthode Lowry modifiée a permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Influence du chlorure de potassium (0,1—2 M) sur les valeurs de l'extinction à concentration constante de la protéine (20 μg/ml).

Fig. 2. — Influence du chlorure de potassium (0,01—0,09 M) sur les valeurs des extinctions à concentration constante de la protéine (20 μg/ml).

Fig. 3. — Courbes d'étalonnage :



en l'absence du chlorure de potassium ;
en présence du KCl (0,05 M) ;
en présence du KCl (0,1 M).

BIBLIOGRAFIE

1. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
2. G. L. Miller, Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
3. S. V. Perry, M. Zydowo, Biochem. J., **71**, 220 (1959).
4. D. J. Hartshorne, S. V. Perry, Biochem. J., **85**, 171 (1962).

BRITISH MEDICAL BULLETIN

În 1962 a apărut volumul 18 al revistei „British Medical Bulletin", format din trei numere. Fiecare din aceste numere este axat pe o temă. Astfel nr. 1 al revistei este închinat geneticii microorganismelor, nr. 2 — cortexului suprarenalei, iar nr. 3 — microscopului eletronic.

Fiecare număr este editat sub conducerea științifică a unui specialist în domeniul respectiv, care prezintă în introducere necesitatea și scopul publicării materialului prezentat.

Prezentăm nr. 2 al revistei, dedicat cortexului suprarenalei. În introducere se arată că dezvoltarea vertiginoasă a cunoștințelor în domeniul cortexului suprarenalei, cu apariția de specialiști numai în anumite direcții strict delimitate ale acestei probleme, pune problema publicării unor articole de ansamblu, pentru sintetizarea materialului răspîndit în diferite lucrări. Apariția, din cînd în cînd, a acestor sinteze este socotită necesară atît pentru înțelegerea datelor acumulate, cît și pentru expunerea mai multor puncte de vedere pe marginea aceluiași subiect. În felul acesta se crează posibilitatea prezentării de diferite ipoteze care pot forma baza dezvoltării ulterioare a problemei.

Articolele din acest număr sînt axate pe direcțiile mai mult cercetate în ultimul timp și se grupează în jurul următoarelor subiecte :

1. Sinteza și mai ales biosinteza hormonilor steroizi ai suprarenalei. Articolele sînt următoarele : „Steroizii suprarenalei : sinteza compușilor naturali și a unor analogi" de B. A. Hems ; „Studii asupra biogenezei steroizilor suprarenalei" de J. K. Grant ; „Producerea de steroizi ai suprarenalei de către placentă, foetus și noi născuți" de R. V. Short și „Secreția de aldosteron la om" de J. N. Mills.

2. Dezvoltarea cortexului în scara animală pînă la om. Articolele sînt următoarele : „Cortexul suprarenalei la toate vertebratele" de I. Chester Jones, J. G. Phillips și D. Bellarny ; „Cortexul suprarenalei la animalele domestice" de W. E. Balfour și „Morfologia și citologia secretorie a cortexului suprarenalei la om" de T. Symington.

3. Fiziologia și biochimia hormonilor steroizi. Articolele sînt următoarele : „Transportul și metabolismul steroizilor" de I. H. Mills ; „Importanța fiziologică a cortisolului" de J. C. Beck și E. E. McGarry ; „Acțiunile steroizilor suprarenalei la nivel celular" de I. E. Bush și „Mecanismul controlului suprarenal" de M. Saffran.

4. Modificările patologice ale cortexului suprarenalei, cu repercusiunile lor asupra metabolismului hormonilor steroizi. Articolele sînt : „Tulburările biosintezei la om" de R. V. Brooks și „Metode recente pentru cercetarea tulburărilor cortexului suprarenalei" de Ch. H. Gray.

5. Aldosteronul (biosinteză, fiziologie, biochimie și patologie). Articolele sînt: „Controlul secreției aldosteronului" de R. D. Wright; „Proprietățile biologice ale aldosteronului: implicațiile fiziologice și patologice" de E. J. Ross și „Secreția de aldosteron la om" de J. N. Mills.

De remarcat este omogenitatea de prezentare a articolelor, cu împărțirea în capitole și subcapitole ale căror titluri sînt date la începutul fiecărui articol. Autorii sînt specialiști cunoscuți în domeniul respectiv și, îmbinînd propriile lor lucrări cu majoritatea materialelor publicate pe aceeași temă, reușesc să prezinte articole serios documentate. De altfel și foarte numeroasele indicații bibliografice (între 20 și 150) indică atît profunzimea, cît și acoperirea ultimelor cercetări din domeniul studiat.

Revista nu are pretenția să acopere toate ramificațiile dezvoltate în decursul timpului în studiul cercetării cortexului suprarenalei, ci caută să acopere toate aspectele cercetărilor actuale, ridicînd probleme și prezentînd puncte de vedere și expuneri diferite asupra acelorași teme. În felul acesta ea ajunge să-și realizeze cu succes scopul propus.

Poate că publicarea titlurilor articolelor din bibliografie, și nu numai numele autorilor și revista, ar aduce pentru cititor o contribuție mai substanțială la înțelegerea materialului, mai ales în cazul articolelor de ansamblu mai scurte.

Revista are o rubrică mai deosebită, și credem că binevenită, numită „note asupra autorilor articolelor publicate în numărul curent". Sînt note extrem de scurte, unde se prezintă autorii cu locurile de muncă din trecut și din prezent, cu domeniile lor de cercetare actuale și din trecut, cu indicarea bibliografiei pentru lucrările mai principale, cu titlul și coautorii eventuali ai cărților publicate. În felul acesta cititorul poate stabili o legătură mai strînsă între articolul studiat și autorul lui.

Ultimile pagini ale revistei sînt date pentru „Revista cărților". Se face o prezentare de cărți recent apărute, al căror conținut însă este axat pe aceeași temă cu aceea a numărului revistei. Astfel, la nr. 2, cărțile prezentate sînt numai pe temă, „cortexul suprarenalei".

De subliniat prezentarea grafică îngrijită și sobră a revistei.

C. Șelariu

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1479. LUCA N., *Metabolismul acidului glutamic și glutaminei în sistemul nervos central.* Studii și cercet. neurol., 1961, **VI**, *3*, 493—506.

Referat general cu 48 indicații bibliografice.

N. Luță-Moldoveanu

1480. ELIAS S., ELIAS M., VINTILĂ I., POPESCU A. și SZATHMARY I., *Contribuții la problema evaluării cantitative a electroforezei pe hîrtie.* Studii și cercet., chim., Timișoara, 1962, **IX**, *1—2*, 47—55.

Autorii au studiat influența hîrtiei (Whatman nr. 1 și nr. 4, Schleicher-Schüll nr. 60 și hîrtie de filtru calitativă fabricată în R.P.R.) asupra rezultatelor calitative și cantitative în analiza electroforetică a fracțiunilor serice și au ajuns la concluzia că din punct de vedere cali-

tativ, separarea pe hîrtie indigenă este satisfăcătoare. Deşi mobilităţile fracţiunilor sînt mai mici şi are loc o absorbţie neglijabilă a fracţiunii albuminice, din aplicarea calculului probabilităţilor reiese că hîrtia romînească poate fi întrebuinţată cu succes în determinările cantitative curente din clinici.

N. Luţă-Moldoveanu

1481. ELIAS S., ELIAS M., VINTILĂ I., POPESCU A. şi SZATHMARY I., *Contribuţii la problema reproductibilităţii electroforezei pe hîrtie.* Studii şi cercet. med., Timişoara, 1962, **IX**, *1—2*, 105—114.

Analiza varianţei, efectuată pentru toate fracţiunile a 60 de benzi electroforetice (de patru ori cîte 15), arată în multe cazuri diferenţe semnificative, la unele fracţiuni, între diverşi cercetători. Autorii analizează sursele principale de eroare, subiectivă şi obiectivă, şi recomandă pentru evitarea lor : 1) determinarea numai a fracţiunilor care prezintă interes, restul fiind determinat global ; 2) determinarea o dată pentru totdeauna, în fiecare laborator, a preciziei metodei folosite, pentru fiecare fracţiune în parte ; 3) comunicarea metodei exacte de lucru, deoarece compararea rezultatelor obţinute prin tehnici diferite este aproape imposibilă ; 4) din motivul arătat anterior, se impune o standardizare a tehnicii electroforezei pe hîrtie, pe linie de Stat.

L. Arnet

1482. VANGHELOVICI M., VANGHELOVICI V., LUPŞA I. şi HAFFNER N., *Studiul cupremiei în diferite boli. Sinteza unor reactivi organici pentru dozarea cuprului în sînge.* Studii şi cercet. med., Timişoara, 1962, **IX**, *1—2*, 142—155.

Se descrie o metodă nouă, precisă, pentru dozarea cuprului în sînge. Determinarea cupremiei, în condiţiile arătate, în diferite maladii, a dus la următoarele rezultate : 1) în boala canceroasă se obţin în general valori normale ; o anumită creştere se constată în cazuri grave cu metastaze ; 2) în tuberculoză se obţin în general valori normale. În aproximativ 35 % din cazuri, se observă o creştere a cupremiei, datorită probabil unor procese infecţioase mai intense ; 3) în reumatism, cupremia este foarte crescută, cîteodată pînă la 300 %. 4) în diabet, afecţiuni renale — valori în general normale. 5) în unele afecţiuni mintale, ca boala lui Wilson, cupremia este scăzută ; dimpotrivă, ea este crescută în schizofrenii.

L. Arnet

1483. CONSTANTINESCU A., CRISTEA A. şi REMUS E., *Aparate şi procedee de electroforeză în zone.* Farmacia, 1961, *11*, 641—654.

Referat general cu 25 indicaţii bibliografice.

S. Vasu

1484. OERIU S., LUPU E. R., OERIU I., DRĂGHICI D., BERBINSCHI C. şi BĂRZOI D. *Studii asupra preparării şi experimentării biologice a unor complecşi coloidali ferici zaharaţi injectabili.* Farmacia, 1961, *11*, 655—660.

Se descriu metodele de preparare a unor complecşi de fier coloidali zaharaţi cu proprietăţi asemănătoare fier-dextranului, folosind materii prime indigene. Eficacitatea produselor obţinute a fost cercetată pe un număr de 408 purcei cu anemie feriprivă, faţă de 171 martori; rezultatele obţinute duc la concluzia introducerii în practică a complecşilor fier-lactoză şi fier-soldextrină.

S. Vasu

1485. COŞOVEANU G., *Observaţii privind determinarea colorimetrică a plumbului din apă, cu ditizonă.* Farmacia, 1961, *11*, 677—680.

Se dau o serie de detalii asupra precauţiilor ce trebuie luate la determinarea plumbului în apă, cu ditizonă; metoda devine astfel foarte rapidă, permite executarea de analize în serie şi nu necesită aparatură complicată.

S. Vasu

1486. KISS ŞT., *Unele probleme ale enzimologiei solului.* Lucr. şt. Centr. exp. îngr. bact., 1960, **III**, 335—346.

Se arată care sînt enzimele din sol puse în evidenţă pînă în prezent de către diferiţi cercetători. Se dau 100 referinţe bibliografice.

H. Filipescu

1487. PĂUNESCU-PODEANU A., *Problema hipodisproteinemiei nefrotice (Contribuţii la precizarea esenţei patologice a sindromului nefrotic).* Med. int., 1962, **XIV**, *9*, 1027—1033.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1488. CIOCAN A., *Acidoza tubulară renală.* Med. int., 1962, **XIV**, *9*, 1053—1063.

Referat general cu 19 indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1489. NICOLAU S. ŞT., NASTAC E. şi ANAGNOSTE B., *Cercetări experimentale în domeniul oncolizei virale.* Oncol., radiol., 1962, I, *1*, 3—15.

Referat general cu 92 indicaţii bibliografice.

M. Furnică

1490. HERŞCOVICI H. şi CIOBA GH., *Probleme de fiziopatologie şi protecţia chimică în boala de iradiaţie.* Oncol., radiol., 1962, I, *2*, 173—182.

Referat general cu următoarele capitole : I. Protecţia chimică cu aminoacizi ce conţin sulf. II. Profilaxia bolii de iradiaţie cu aminoacizi şi amine care nu conţin grupul SH. III. Participarea vitaminelor şi fermenţilor în profilaxia bolii de iradiaţie. IV. AET. V. Properdina. VI. Serotonina. Referatul conţine 25 indicaţii bibliografice.

M. Furnică

1491. ROSIN S., *Tehnica pentru determinarea celularităţii măduvei osoase la şobolan. Standardizarea volumetrică.* Oncol., radiol., 1962, I, *3*, 243—246.

Se prezintă amănunte tehnice ale acestei determinări.

M. Furnică

1492. FODOR GY. şi RÁCZ G., *O nouă posibilitate de obţinere a prafului de alge utilizabil în scopuri alimentare.* Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *3*, 305—307.

Se discută posibilităţile de obţinere a culturilor de alge monocelulare, pe scară mare, în bazinele de înot cu apă încălzită, urmărindu-se anumiţi factori care influenţează dezvoltarea algelor. Se expune metoda utilizată pentru obţinerea unui praf omogen de *Scenedesmus.*

S. Vasu

1493. COSTACHE AL. şi MIRESCU AL., *Aspecte enzimologice ale etiopatogeniei afecţiunilor bucodentare şi rolul jucat de enzime în terapia stomatologică.* Stomatol., 1962, IX, *2*, 117—124.

Referat general cu 67 indicaţii bibliografice.

S. Mihăescu

1494. IDU S. M., *Asupra colesterolemiei și metodelor de dozare.* Viața med., 1962, **IX**, *16*, 953—958.

Se trec în revistă chimia și originea colesterolului, valorile normale și patologice ale colesterolemiei, modul în care se poate influența colesterolemia și metodele de dozare. Bibliografia cuprinde 26 indicații.

D. Moțet-Grigoraș

1495. PEIVE I. V., *Rolul microelementelor în metabolismul plantelor agricole și sporirea productivității lor.* An. rom.-sov., agric., zoot., 1962, *3*, 9—28.

Se arată participarea micro- și macroelementelor în reacțiile enzimatice, în procesele de oxido-reducere, influența pozitivă a unor microelemente asupra fotosintezei și în activarea enzimelor implicate în metabolismul proteic la plantele agricole, cît și participarea microelementelor în reacțiile enzimatice din celulele microorganismelor din sol. Referat de ansamblu cu 17 referințe bibliografice.

H. Filipescu

1496. BRESLER S. E. și EGOROV A. I., *Teoria și practica cromatografiei continui.* An. rom-sov., biol., 1962, *2*, 139—149.

Se descrie și se discută tehnica procedeului de cromatografie continuă, necesar în procesele de separare fină.

L. Arnet

1497. BELOUSOVA A. K., *Aportul biochimiei la elaborarea metodelor de chimioterapie a tumorilor.* An. rom.-sov., biol., 1962, *3*, 45—63.

Referat general cu 85 indicații bibliografice.

L. Arnet

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

1498. SILBERG AL., SIMITI I. și MANTSCH H., *Contribuții la studiul tiazolilor. II. Asupra obținerii unor aminoacizi tiazolici.* Studii și cercet. chim., Cluj, 1961, **XII**, *2*, 315—319.

Datorită interesului biologic pe care l-ar putea prezenta, autorii au condensat unii 2-fenil-4-formiltiazoli cu acidul benzoil-amino-acetic (ac. hipuric) și au obținut aminoacizii corespunzători (prin intermediul azolactonelor).

N. Luță-Moldoveanu

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

V. ENZIME

VI. VITAMINE. HORMONI. ALȚI COMPUȘI BIOACTIVI

1499. VAISLER L. și COSTINER E., *Noi cercetări experimentale asupra acțiunii antitiroxinice și hepatoprotectoare a hormonului epifizar.* Studii și cercet. endocrinol., 1962, *1*, 57—64.

Pe cîini cu ficat lezat cu CCl_4, la care s-a creat o stare de hipertiroidie experimentală, se studiază acțiunea antitiroxinică și hepatoprotectoare a hormonului epifizar. Datele obținute confirmă acțiunea hepatoprotectoare și antitiroxinică a acestui hormon și capacitatea sa de a bloca apariția hipertiroidiei experimentale, la animale cu ficat lezat. Se consideră că sediul principal al acțiunii hormonului epifizar se găsește la nivelul mitocondriilor celulare.

D. Cotariu

1500. SĂHLEANU V. și HOLBAN R., *Cercetări privitoare la condiționarea metabolică a acțiunii tiroxinei. I. Modificarea efectului metamorfogen al tiroxinei prin substanțe active asupra lanțului oxidativ.* Studii și cercet. endocrinol., 1962, *1*, 65—72.

Se cercetează pe mormoloci de broască efectul produs de 20 substanțe (care afectează procesele biochimice ale lanțului oxidativ și respirator) asupra metamorfozei spontane și induse de către tiroxină. Din rezultatele obținute reiese că funcționarea lanțului oxidativ condiționează efectul metamorfogen ; fondul problemei însă nu este încă lămurit. Se discută unele consecințe teoretice și practice.

D. Cotariu

1501. CONSTANTINESCU C., DE SIMON M. și ARVANITOPOL N., *Considerații asupra valorii unor teste biologice de titrare a gonadotropinelor serice.* Studii și cercet. endocrinol., 1962, *1*, 81—94.

Se cercetează cu ajutorul diferitelor teste biologice, valoarea gonadotropinelor serului de iapă gestantă, preparate de Institutul Pasteur din București, în 1959 și 1960. S-a ajuns la următoarele concluzii : Testul Galli-Mainini are valoare redusă chiar și în determinarea calitativă a gonadotropinelor serice, de asemenea testul pe pui de o zi. Testul Friedmann-Schneider, pe iepuroaică tînără, este o metodă ideală de apreciere atît calitativă cît și cantitativă a gonadotropinelor serice. Testul Ascheim-Zondek, pe șoricioaică impuberă, este o metodă bună de titrare a gonadotropinelor serice.

D. Cotariu

1502. VAISLER L., BIENER J. şi COSTINER E., *Cercetări cu privire la glucuronoconjugarea hepatică la animalele tratate cu triiodotironină şi tiroxină.* Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *1*, 120—122.

Administrarea de triiodotironină în doze mari şi în tratament cronic nu prezintă nici o acţiune asupra funcţiei de conjugare a ficatului la câini. Chiar în administrare unică, tiroxina accelerează ritmul de conjugare a ficatului prin creşterea cantităţii totale de acid glucuronic eliminat în primele 6 ore.

D. Cotariu

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1503. SORU E., SZABADOS J., TĂNĂSESCO D. et PARASCHIVESCO M. *La phosphorylation oxydative chez le* Mycobaterium tuberculosis *B.C.G. et ses variantes résistentes à la streptomycine, au PAS et à l'INH.* Arch. roum. pathol. expér., 1962, **XXI**, *1*, 59—68.

Rezultatele arată apariţia unei decuplări a fosforilării oxidative o dată cu instaurarea rezistenţei la antibioticele amintite. Întrebuinţând ca substrat malatul cu raportul P/O, prezintă valoarea 3,0 pentru tulpina de origine, 2,4 pentru varianta streptomicino-rezistentă, 1,2 pentru cea PAS-rezistentă şi 2,0 pentru cea INH-rezistentă. Meradiona are o acţiune intensă de decuplare a fosforilării la toate tulpinile citate, se pare că datorită unei activări intense a consumului de oxigen, paralel cu o inhibiţie a esterificării fosfatului anorganic. Meradionreductaza prezintă o activitate mai mică la variantele rezistente faţă de cea de origine.

D. Tănăsescu

1504. ESKENASY A. et PĂUNESCO E., *Contribution à l'étiologie de certaines lésions giganto-cellulaires survenues au cours de la chimiothérapie de la Tuberculose. Étude expérimentale et biochimique.* Arch. roum. pathol. expér., 1962, **XXI**, *1*, 69—79.

Inocularea la cobai a unei culturi de bacili tuberculoşi filtrată (Seitz EK) cu un adaos de INH (20 mg/ml) produce la nivelul plămînilor procese proliferative nodulare giganto-celulare. Analiza biochimică a filtratului inoculat în comparaţie cu unul nesupus acţiunii INH-ului, arată o creştere a proteinelor acido-solubile, fosfatidelor, ceridelor, sfingomielinelor şi a polizaharidelor de origine bacteriană. Se verifică ipoteza după care leziunile giganto-celulare pulmonare umane se datoresc proceselor de liză provocate de terapia cu INH.

D. Tănăsescu

1505. BALDOVIN-AGAPI C., BELOIU I. et PLECEAŞ P., *Contribution à l'étude de la structure antigénique des streptocoques non-hémolytiques. III. Les antigènes des streptocoques du groupe D (entérocoques)*. Arch. roum. pathol. expér., 1962, **XXI**, *1*, 115—129.

Cu ajutorul unei soluţii de dezoxicolat de sodiu 2% s-au extras, din 14 tulpini de streptococi din grupul D, antigene de tip şi de grup. Printre antigene s-au identificat o dezoxi- şi o ribonucleoproteină. Au mai fost separate polizaharide de perete care conţin galactoză, glucoză, ramnoză şi hexozamine.

D. Tănăsescu

1506. TOMESCU E., VÎNTU O., GHEORGHIU V. şi MĂNUCĂ L., *Rezultatele în legătură cu păstrarea culturilor de* Azotobacter chroococcum *(III. Conţinutul în aminoacizi)*. Lucr. şt. Centr. exp. îngr. bact., 1960, **III**, 129—133.

Conservarea sub ulei de parafină sau sub NaCl 50‰, la temperatura de 5 sau de 28°C, folosind ca sursă de carbon benzoatul de sodiu sau zaharoza, nu a modificat conţinutul calitativ în aminoacizi al microorganismului *Azotobacter chroococcum*. Folosirea benzoatului de Na, cît şi conservarea cu ulei de parafină la 28°C a mărit conţinutul de aminoacizi în celule.

H. Filipescu

1507. BLAZEK V., *Contribuţii la studiul acizilor nucleinici virali. 2. Cercetări în legătură cu acţiunea antigenică a acidului ribonucleinic al virusului* Coxsackie. Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *3*, 302—305.

Se cercetează acţiunea antigenică a ARN extras din virusul *Coxsackie* şi raportul acestuia cu proteinele virale, arătîndu-se că ARN nu are efect antigenic şi că organismul produce anticorpi numai împotriva proteinelor din virus.

S. *Vasu*

1508. RACZ G., FAZAKAS B. şi HORVÁTH G., *Filadelfina, un nou antibiotic cu acţiune tricomonacidă, în florile de* Philadelphus coronarius L. Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *4*, 424—427.

Se cercetează acţiunea tricomonacidă a extractelor apoase ale diferitelor părţi ale florilor de *Philadelphus coronarius L.* — dovedindu-se că antibioticul denumit de autori „filadelfina" se găseşte în cantitate mai mare în anterele plantei.

S. Vasu

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1509. BÎLTEANU GH., BRAD I. şi RADU V., *Influenţa nutriţiei minerale asupra activităţii catalazei la floarea-soarelui şi porumb.* Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1962, **XIV**, *3*, 287–297.

În perioada creşterii iniţiale a plantelor de floarea-soarelui şi porumb, lipsa N, P sau K din mediul de nutriţie a determinat scăderea activităţii catalazei, cea mai mare depresiune fiind provocată de lipsa azotului. În perioada de creştere, pînă la apariţia inflorescenţei la floarea-soarelui sau pînă la înspicarea porumbului, lipsa N a determinat reducerea la jumătate a activităţii catalazei faţă de regimul normal de nutriţie, în timp ce lipsa P sau K a determinat o creştere a activităţii catalazei.

H. Filipescu

1510. CONSTANTINESCU D. GR., TARPS E. şi TIEN-DINH-DUC, *Contribuţii la studiul localizării şi dinamicii flavonoidelor în speciile de* Tagetes patulus L. *şi* Tagetes erectus L. Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1962, **XIV**, *3*, 299–308.

Oxiflavonolii se găsesc repartizaţi în toate organele aeriene ale celor două specii de *Tagetes* studiate, iar în rădăcină numai în regiunea coletului. Capitulele florale acumulează cea mai mare cantitate de oxiflavonoli, florile ligulate fiind mult mai bogate decît cele tubulare. Conţinutul în flavonoide înregistrează un maxim la florile tinere şi scade pe măsură ce florile se apropie de fructificare. Curba variaţiei diurne prezintă un maxim dimineaţa şi un minim seara.

H. Filipescu

1511. ŞTEFAN V., ANIŢIA N., BOTI D. şi VOICULESCU M., *Studiul nutriţiei plantelor de tutun cu ajutorul izotopului radioactiv al fosforului prin aplicarea îngrăşămintelor chimice bacteriene.* Lucr. şt. Centr. exp. îngr. bact., 1960, **III**, 171–179.

Capacitatea de încorporare a P radioactiv de către diferite organe ale plantei de tutun a variat în funcţie de vîrsta organului şi de rolul acestuia în plantă : frunzele tinere de la vîrful plantei au asimilat mai intens P decît cele de la bază ; frunzele şi capsulele (cu seminţe) au avut un conţinut mai ridicat de P decît tulpinile şi rădăcinile.

H. Filipescu

1512. FLORESCU M. şi CERNEA S., *Studiu asupra variaţiei conţinutului în carotenoide şi zahăr la morcovi în funcţie de microelementele magneziu, bor, cupru, zinc şi molibden, aplicate pe agrofonduri diferite.* Lucr. şt. Inst. Agr. „Dr. P. Groza" Cluj, **XVII**, 75–82 (fără anul apariţiei).

Sinteza carotenoidelor şi zahărului din morcovi a fost influenţată pozitiv de aplicarea azotului ca îngrăşămînt radicular. Borul, magneziul şi zincul aplicate extraradicular, au stimulat sinteza carotenoidelor ; cuprul şi molibdenul au mărit conţinutul în α-carotină şi l-au micşorat

pe cel de β-carotină. Indiferent de agrofond, toate microelementele folosite au dus la creşterea conţinutului de zahăr, efectul maxim fiind constatat în cazul magneziului.

H. Filipescu

1513. SCĂRLĂTESCU N. şi BURNEA I., *Contribuţii la cunoaşterea dinamicei acumulării substanţelor minerale la secara cultivată pe nisipurile de la Tîmbureşti şi tratată radicular cu diferite îngrăşăminte chimice.* Lucr. şt. Inst. Agr. „T. Vladimirescu" Craiova, 1960, 189—198.

La secară, consumul maxim de N a corespuns cu faza de înflorire, consumul maxim de P cu faza de înspicare, iar cel de K cu fazele de înfrăţire şi formarea paiului. Prezenţa N a stimulat asimilarea P şi în mare măsură pe aceea a K. Boabele obţinute de la secara tratată cu îngrăşăminte chimice au conţinut mai mult N şi P şi mai puţin K decît boabele martorului.

H. Filipescu

1514. SCĂRLĂTESCU N. şi BURNEA I., *Contribuţii la cunoaşterea dinamicei acumulării substanţelor minerale la secară, sub influenţa îngrăşămintelor extraradiculare.* Lucr. şt. Inst. Agr. „T. Vladimirescu" Craiova, 1960, 201—208.

Sub influenţa stropirilor efectuate în timpul înspicării cu soluţii de azotat de amoniu, superfosfat şi săruri potasice s-a constatat că a crescut conţinutul în azot, respectiv fosfor şi potasiu, atît în tulpini cît şi în spice. Conţinutul de N, P şi K din paie şi spice scade pe măsură ce planta se maturizează. În timpul vegetaţiei, cea mai mare cantitate de N şi P se găseşte în spice, iar cea mai mare cantitate de K în tulpini.

H. Filipescu

1515. HOROVITZ C., *Fosfatazele la plantele superioare.* Natura, seria biol., 1962, **XIV**, *1*, 11—18.

După o trecere în revistă a cercetărilor din ultimele decenii asupra clasificării, distribuţiei, metodelor de determinare, biochimiei şi importanţei practice a studiului fosfatazelor, autorul prezintă datele privitoare la activitatea fosfatazelor din floarea-soarelui. Activitatea fosfatazei acide şi bazice este mai mare la plantele crescute pe podzol decît la cele cultivate pe cernoziom. Activitatea cea mai mare este în miezul seminţelor, urmată de frunze ; ea este mult mai mică în rădăcini. Activitatea fosfatazei bazice este mai slabă decît a celei acide. Atît la plantele care au suferit carenţa fosforului, cît şi la cele crescute pe un sol cu o umiditate scăzută, activitatea fosfatazelor este mai mare decît la cele cu regim normal de nutriţie şi de umiditate.

N. Luţă-Moldoveanu

1516. ZUGRĂVESCU GH. şi ZUGRĂVESCU D., *Influenţa presiunii osmotice a soluţiei solului asupra aprovizionării plantelor cu apă.* Natura, seria biol., 1962, **XIV**, *1*, 49—52.

Pe baza rezultatelor obţinute cu metoda crioscopică se trage concluzia că presiunea osmotică a soluţiei solului creşte cu conţinutul ei în săruri, valoarea limită pentru dezvoltarea plantei fiind aproximativ de 18—20 m.c./cation.

N. Luţă-Moldoveanu

1517. SĂULESCU N., IONESCU M., IVĂNESCU M., FERANDO M. şi BÎRSAN M., *Influenţa condiţiilor pedoclimatice asupra calităţii bobului la diferiţi hibrizi de porumb.* Probl. agric., 1962, **XIV**, *5*, 49—56.

La cei 16 hibrizi dubli de porumb analizaţi, provenind din 5 regiuni diferite de cultură, s-a constatat o mare variaţie a conţinutului de amidon şi proteină, în funcţie de condiţiile de mediu, şi o mai mică variaţie între diferiţii hibrizi cultivaţi în acelaşi cîmp experimental. Conţinutul de grăsime a prezentat variaţii mari între diferiţii hibrizi, dar pentru un acelaşi hibrid, a rămas constant la variaţia regiunii de cultură.

H. Filipescu

1518. GALAN-FABIAN G., *The diurnal march of photosynthesis.* Revue biol., 1961, **VI**, *4*, 401—410.

În zilele lungi, luminoase, cu o temperatură între 17—30°C, şi în condiţii de umiditate a solului suficientă, fotosinteza, determinată pe baza curbei de eliminare a bioxidului de carbon marchează un prim maxim în cursul dimineţii şi un al doilea maxim după amiază, cu o depresiune în timpul amiezii. În zile cu temperatură peste 30°C şi lumină puternică, fotosinteza are un singur maxim dimineaţa. În zile mai scurte, luminoase, cu temperaturi între 15—25°C, curba fotosintezei are aproape forma unui clopot, cu maximul în jurul prînzului.

D. Moţet-Grigoraş

1519. BRAD I. şi VĂLUŢĂ GH., *Rezultate obţinute prin aplicarea iarovizării la cîteva plante agricole în R.P.R.* An. rom.-sov. agric., zoot., 1962, *2*, 49—61.

Cercetările biochimice întreprinse pe soiurile de grîu A 15 şi Cenad 117, iarovizate normal şi în soluţie de pirocatehină $1^0/_{00}$ şi H_2O_2 $1{,}7^0/_{00}$, au arătat că iarovizarea intensifică exosmoza P anorganic şi a N amoniacal, micşorează conţinutul în gluten şi amidon, intensifică activitatea esterazei şi măreşte puternic conţinutul în substanţe reducătoare, mai ales către sfîrşitul iarovizării. Activitatea catalazei creşte în primele 20—25 zile, după care se menţine constantă, iar aceea a peroxidazei începe să crească după 20—25 zile; consumul de oxigen creşte în primele

15—20 zile, apoi înregistrează o ușoară scădere și, din nou, o creștere spre sfîrșitul procesului. Curba acidității titrabile este asemănătoare cu aceea a activității catalazei.

H. Filipescu

1520. RUBIN B. A. și LADÎGHINA M. G., *Natura acțiunii unor antibiotice asupra plantelor superioare*. An. rom.-sov., biol., 1962, *2*, 50—69.

Tulburarea sintezei pigmenților din plantele superioare sub influența streptomicinei, constituie după părerea autorilor, rezultatul influenței complexe exercitate de streptomicină asupra unei serii întregi de verigi ale metabolismului ; streptomicina ar acționa în special asupra aparatului oxidativ al plantelor ; acest efect, la rîndul lui, este extrem de complex : streptomicina inhibă citocromoxidaza și polifenoloxidaza, dar activează ascorbinoxidaza și peroxidaza determinînd înlocuirea unor sisteme oxidative cu altele.

L. Arnet

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1521. VAISLER L., BIENER J. și COSTINER E., *Date cu privire la electroforeza proteinelor și a transaminazelor serice la animale tratate cu triiodotironină*. Studii și cercet. endocrinol., 1962, *1*, 123—125.

Administrarea de triiodotironină în doză mare și în tratament cronic nu produce nici un fel de modificări ale electroforezei proteinelor și a transaminazelor serice, la cîini.

D. Cotariu

1522. BENETATO GR., BACIU I., SECĂREANU ȘT., COJOCARU A., MACODEAN I., VITEBSCHI V. și SOLTUZ V., *Influența asupra fagocitozei a fracțiunilor globulinice din ser, izolate prin cromatografie pe coloană cu derivați ai celulozei*. Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *1*, 9—31.

Experiențe efectuate pe cîini și iepuri au arătat că din proteinele plasmatice adsorbite pe $BaSO_4$ și eluate cu citrat se pot izola prin cromatografie pe DEAE-celuloză o fracțiune (beta- și alfa-globulinică) cu proprietăți fagocito-stimulatoare, care reprezintă 6—19% din proteinele adsorbite. Fracțiunea cromatografică gama eluată de pe carboximetilceluloză (CMC) cu tampon fosfat posedă cea mai pronunțată activitate fagocito-stimulatoare. S-a constatat existența unei relații între activitatea fagocitară și mobilitatea leucocitelor, în sensul că activitatea fagocitară mărită este asociată cu mobilitatea mărită ; unele fracțiuni însă, stimulează mobilitatea leucocitelor, fără a influența fagocitoza

H. D. Schell

1523. PASCALOV-STOENESCU L., *Contribuții la studiul mecanismelor de reglare a glicemiei III. Scăderea glicemiei prin acțiunea reflexă a concentrațiilor crescute de glucoză.* Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *2*, 245—248.

Experiențe efectuate pe pisici anesteziate cu eter și cu cloraloză au arătat că perfuzarea unei anse intestinale in situ cu un lichid cu conținut crescut de glucoză determină scăderea glicemiei în circulația generală, scădere ce se accentuează pe măsură ce perfuzia continuă.

H. D. Schell

1524. PASCALOV-STOENESCU L., *Contribuții la studiul mecanismelor de reglare a glicemiei. Nota IV. Unele particularități în mecanismul de reglare reflexă a glicemiei.* Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *2*, 249—256.

Rezultatele cercetărilor arată că în afară de mecanismul umoral de reglare a glicemiei prin acțiunea directă a glucozei asupra insulelor lui Langerhans, există și un mecanism reflex de reglare. În cazul unui aport mărit de glucoză, acest mecanism nervos precede și dublează pe cel umoral.

H. D. Schell

1525. CÎRSTEA M. și SUHACIU GH., *Asupra efectului antianafilactic al fenilbutazonei la cobai.* Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *2*, 257—261.

Tratamentul cu fenilbutazonă în doză de 150 mg/Kg corp aplicată intramuscular, exercită un efect protector asupra letalității totale în șocul anafilactic pasiv la cobai și reduce într-o măsură foarte însemnată numărul animalelor ce mor precoce. Acest tratament nu modifică însă letalitatea și nici modalitatea morții produse prin injectarea intracardiacă de histamină. Aceste rezultate demonstrează că efectul antianafilactic al fenilbutazonei se produce prin interferarea mecanismelor cu procesul eliberării de histamină și de alți mediatori anafilactici.

H. D. Schell

1526. MISON-CRIGHEL N. și KREINDLER A., *Utilizarea fosfaților exogeni și reglarea renală a acestora după accese convulsive repetate.* Studii și cercet. neurol., 1961, **VI**, 3, 379—389.

Determinările făcute la 24 ore după ultima administrare arată că, la câine, supraîncărcarea cu fosfați timp de 3 zile nu duce la modificări semnificative în compoziția sîngelui. În urină recoltată concomitent, fosforul crește semnificativ. După administrarea unei cantități duble de fosfați (880 mg) se constată o scădere neconcludentă de ac. lactic, o mărire nesemnificativă de

ac. piruvic şi o mărire semnificativă a P anorganic. În urină, modificările fosforului excretat şi raportul P absorbit/P filtrat sînt similare acelora ce preced accesele convulsive: mărirea P excretat şi scăderea cantităţii absolute de P reabsorbit. După accese convulsive repetate, toate curbele componentelor sangvine şi urinare (determinate în interval de 3 ore) sînt inversate faţă de curbele înscrise înainte de accese.

N. Luţă-Moldoveanu

1527. STOICA E., STRUNGARU G. şi GHIZARI E., *Influenţa activităţii motorii libere asupra acţiunii hipokaliemiante a clorpromazinei.* Studii şi cercet. neurol., 1961, VI, *4*, 601—609.

Administrarea clorpromazinei la cîini, în doză de 1 mg/Kg la 30—40 min după efortul muscular şi ingerarea de 125 g praf de carne şi pesmet, determină o scădere a potasemiei de 35,30% faţă de culoarea de fond. Aceeaşi doză de cloroplasmină, injectată la 30 min după ce animalele desfăşurau un stereotip de reflexe condiţionate motorii, determina o scădere a potasemiei numai de 14,33%. Reducerea acţiunii hipokaliemiante a clorpromazinei după comportament este o consecinţă a activităţii reflex condiţionate a animalelor şi pare a fi datorită factorilor umorali eliberaţi în timpul comportamentului şi răspunzători de modificarea raportului dintre potasiul extra- şi intracelular. Indirect se deduce şi intervenţia factorilor colinergici.

N. Luţă-Moldoveanu

1528. COTĂESCU I., DEUTSH G. şi DREICHLINGER O., *Contribuţii la problema mecanismului metabolic al acţiunii substanţelor diuretice de tip purinic, în ţesutul renal.* Studii şi cercet. med., Timişoara, 1962, IX, *1—2*, 62—75.

Cercetări efectuate pe felii de ţesut renal, suspendate într-un mediu lichid, echilibrat din punct de vedere ionic şi în contact permanent cu oxigenul, au dus la următoarele rezultate: 1) diureticele purinice reduc acumularea tisulară renală a acidului p-amino hipuric (PAH); 2) acumularea PAH în feliile de ţesut renal este însoţită de activarea catabolismului glucidelor (coeficient respirator aproape egal cu 1,0); 3) cafeina determină în feliile incubate de ţesut un coeficient respirator egal cu aproximativ 0,7; 4) concentraţia tisulară a compuşilor adenozinpolifosforici (mai ales a ATP) creşte sub acţiunea cafeinei.

L. Arnet

1529. BURUIANĂ L. M., HADARAG EL. şi VARACHIU N., *Cercetări asupra cineticei fosfomonoesterazei eritrocitare la cal în cursul antrenamentului.* Lucr. şt. Inst. Agr. „N. Bălcescu", seria C, 1961, V, 195—202.

Valoarea constantei de disociere K_m şi a coeficientului termic Q_{10} a fosfomonoesterazei eritrocitare creşte în timpul efortului, cu tendinţă de a reveni la valorile iniţiale după 24 ore de la cursă, în cazul cailor antrenaţi. La caii neantrenaţi însă, valorile parametrilor K_m şi Q_{10}, modificate în urma efortului, persistă, ceea ce denotă o scădere accentuată a calităţii fosfomonoesterazei eritrocitare.

H. Filipescu

1530. BÎRZA H., *Date asupra potasiemiei în sindromul uremic la cîine.* Lucr. şt. Inst. Agr. „N. Bălcescu", seria C, 1961, V, 257—260.

Nu s-a putut stabili un paralelism între gradul uremiei (metoda Kovarsky) şi valoarea potasiemiei.

H. Filipescu

1531. GRIGORESCU I., BÎRZA H., IONESCU GH. şi STANCU D., *Cercetări asupra kaliemiei consecutive traumatismului operator la solipede.* Lucr. şt. Inst. Agr. „N. Bălcescu", seria C, 1961, V, 373—378.

Traumatismele operatorii multiple la cai, au pus în evidenţă, la 87% din cazurile studiate, o stare precoce de hiperkaliemie (în medie o creştere de 8,81 % faţă de valorile preoperatorii). Narcoza cu cloralhidrat nu a participat la producerea hiperkaliemiei postoperatorii. Clorurile serice şi formula leucocitară nu au prezentat modificări semnificative.

H. Filipescu

1532. PARHON C. C., POPESCU I. şi PETCU G., *Influenţa acetilcolinei asupra glicemiei.* Lucr. şt. Inst. Agr. „N. Bălcescu", seria C, 1961, V, 433—437.

Acetilcolina provoacă o scădere a glucozei sangvine, scădere care la animalul normal este mascată prin hiperglicemie adrenalinică secundară.

H. Filipescu

1533. REPCIUC E., *Cantitatea de acid dezoxiribonucleic ca măsură a densităţii celulare.* Morfol. norm. pat., 1962, *2*, 125—128.

Conţinutul de ADN al substanţei cerebrale este proporţional cu densitatea sa celulară. Scoarţa emisferelor cerebrale este mai săracă în ADN decît scoarţa emisferelor cerebeloase, ca expresie a conţinutului diferit în celule pe unitate de volum de ţesut. Cantitatea de ADN din cerebel poate fi comparată cu aceea a organelor bogate în ADN. Explicaţia acestui fapt o constituie densităţile celulare apropiate.

D. Cotariu

1534. REPCIUC E., ATANASIU GH., IONESCU E. şi VASILESCU S., *Acţiunea fracţiunilor lipidice extrase din ficatul necrobiotic de şobolan asupra diviziunii celulelor hepatice de şobolan.* Morfol. norm. pat., 1962, *3*, 217—225.

Două fracţiuni lipidice, extrase din ficatul necrobiotic de şobolan, sînt capabile să dezlănţuie mitoze în celulele hepatice de şobolan, şi anume : a) fracţiunea gliceridelor, steridelor, ceridelor, grăsimilor neutre ; b) fracţiunea acizilor fosfatidici. Toate celelalte fracţiuni lipidice din

ficatul necrobiotic de şobolan provoacă leziuni mai mult sau mai puţin adînci ale parenchimului hepatic de şobolan.

L. Arnet

1535. HIMEL H. şi MĂCRINEANU A., *Efectele administrării concomitente de E 39 şi testosteron asupra dezvoltării tumorilor experimentale la şobolani.* Oncol., radiol., 1962, I, *1*, 53—58.

Eficacitatea oncostatică a preparatului E 39 variază în raport cu starea endocrină a animalelor. Acţiunea preparatului este potenţată semnificativ după administrare concomitentă de testosteron.

M. Furnică

1536. COSTĂCHEL O., FURNICĂ M., DRAGON V. şi DUŢU R., *Influenţa radiaţiilor ionizante asupra acumulării peroxizilor lipidici în ţesuturi.* Oncol., radiol., 1962, I, *3*, 205—210.

După iradierea şobolanilor cu 1 000 r se constată o creştere a peroxizilor lipidici din ţesuturi. Viteza de creştere a peroxizilor diferă după ţesut : în splină şi mucoasa intestinală acumularea peroxizilor se constată după 2 zile ; în ficat şi în creier după 3 şi 4 zile ; rinichiul nu prezintă modificări importante în comparaţie cu restul ţesuturilor ; testiculul se peroxidează după 1 şi 5 zile de la iradiere, dar cantitatea absolută de peroxizi din acest organ este mai mică decît în restul ţesuturilor. Iradierea sub protecţie de largactil micşorează gradul de peroxidare, mai ales în ficat şi testicul. Aceste rezultate se compară cu examenul anatomo-patologic.

M. Furnică

1537. MÓZES M. şi FÓRIKA GY., *Acţiunea electroliţilor asupra termoreglării la şobolani.* Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *4*, 422—424.

Temperatura corporală şi consumul de oxigen al şobolanilor scad sub acţiunea NaCl, KCl, $MgSO_4$ şi a gluconatului de calciu administrate prin injecţii.

S. Vasu

1538. МОТЕЛИКЭ И., *Влияние адреналина на гликемию у Карпа.* Revue biol., 1961, VI, *4*, 467—475.

În timpul flămînzirii îndelungate glicemia scade progresiv, dar foarte încet, atingînd limita inferioară a curbei normale abia după jumătate de an. Reacţia hiperglicemică la crapul ce are rezerve de glucide, apare repede, deplină şi prelungită. Deplinătatea reacţiei hiperadrenalinice depinde de rezervele de glucide, astfel încît proba cu adrenalină poate servi de control asupra existenţei acestor rezerve. Hiperglicemia adrenalinică nu depinde de cantitatea de hor-

mon introdusă în intervalul de la 1/3000 la 3000 mg/kg corp. Adrenalina nu provoacă reacții compensatorii insulinice chiar la reacții hiperglicemice foarte puternice. Lipsa acestei reacții apare ca una din cauzele lipsei homeostaziei glucidice la crap.

D. Moțet-Grigoraș

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1539. KREINDLER A., MISON-CRIGHEL N., IONĂȘESCU V., CONSTANTINESCU E., LUCA N. și COSTA-FORU D., *Modificări biochimice în paralizia periodică familială.* Studii și cercet. neurol., 1962, **VII**, *1*, 31—40.

Valorile intercritice ale K, glucozei, ac. piruvic, P anorganic și lipidic, ATP-ului, proteinelor totale, transaminazei, aldolazei s-au găsit în limite normale în sînge la 3 bolnavi cu paralizie periodică familială (tatăl și doi frați). Fe neheminic este scăzut, Cu din sînge este crescut la cei doi frați. La tată Fe neheminic este crescut, iar cupremia normală. Ceruloplasmina e crescută la toți trei bolnavii. În paralizia provocată prin ingerarea a 150 g glucoză și injectarea subcutană a 20 U insulină, K și P anorganic scad paralel la toți trei bolnavii, iar glucoza scade numai la cei doi frați. În biopsia musculară din mușchiul cvadriceps (la tată și fiică) și din mușchiul deltoid (la fiu), în timpul paraliziei provocate s-au găsit valori scăzute numai pentru P total acido-solubil; Fe neheminic extractibil prin pirofosfat este scăzut numai la cei doi frați.

N. Luță-Moldoveanu

1540. LUCA N. și IONĂȘESCU V., *Modificări ionice în boli neurologice degenerative.* Studii și cercet. neurol., 1962, **VII**, *1*, 107—114.

La 93 pacienți cu boli neurologice degenerative (scleroză laterală amiotrofică — 37 cazuri, miopatii — 30 cazuri, degenerescență spino-cerebeloasă — 9 cazuri și porfirie Corec Huntigton și boala lui Wilson — 17 cazuri) s-a găsit constantă o mărire nesemnificativă a Na seric (180 mEq /1) și a raportului Na/K (36,7). În timp ce nivelul K se menține la limite normale. Mg seric prezintă valori normale (2,3 mEq/1) la bolnavii primelor trei grupe și ușor crescută la ultima grupă (3,3 mEq/1). Valorile Fe seric nu sînt crescute decît în scleroza laterală amiotrofică (182,9 mg%). Proteinele totale ale serului nu indică modificări patologice pentru nici o grupă de bolnavi.

N. Luță-Moldoveanu

1541. POPESCU M. și DRĂGĂNESCU ȘT., *Cercetări cromatografice în encefalite și leuconevroxite. Examinarea aminoacizilor liberi din sînge.* Studii și cercet. neurol., 1961, **VI**, *4*, 571—578.

Atît în encefalite cît și în afecțiuni demielinizante (ca scleroza în plăci), aminoacizii sînt în general crescuți. În encefalite (5 cazuri) aminoacizii mai constant crescuți sînt : cistina, glicocolul, acidul glutamic, lizina, histidina, leucina și treonina, iar mai puțin semnificative sînt

creşterile alaninei şi valinei. În leuconevrite (8 cazuri) cresc cistina, leucina, arginina, serina şi glicocolul şi într-o măsură mai puţin semnificativă ac. glutamic şi treonina. În encefalopatia portală (2 cazuri) cresc : lizina, histidina, cistina, serina şi glicocolul. În polinevrita recurentă a nervilor cranieni (un caz) cresc : cistina, lizina, histidina, glicocolul, acidul glutamic, treonina, alanina, valina şi leucina. Corelaţiile stabilite între variaţiile aminoacizilor liberi ai sîngelui, în aceste afecţiuni, duc la presupunerea existenţei unui catabolism proteic în starea de început a bolii, anterior proceselor de demielinizare.

N. Luţă-Moldoveanu

1542. PETRESCU A., *Cercetări histochimice asupra produselor de dezintegrare lipidică în ramolismentul cerebral. Notă preliminară.* Studii şi cercet. neurol., 1961, **VI**, *4*, 587—600.

Reacţiile histochimice pentru lipide au indicat (la 3 cazuri umane) o diferenţă de intensitate a coloraţiei între zona normală şi cea lezată. Macrofagele lipidice au o constituţie heterogenă, punîndu-se în evidenţă fosfolipide, glicolipide, colesterol şi esteri de colesterol. În focare de ramolisment vechi s-au găsit cristale incolore de colesterol — o caracteristică bio- şi histochimică a leziunilor demielinizante.

N. Luţă-Moldoveanu

1543. POPESCU M., *Cercetări cromatografice în boala lui Wilson. Examinarea aminoacizilor liberi din sînge* Studii şi cercet. neurol., 1961, **VI**, *4*, 611—619.

În contrast cu rezultatele altor lucrări, s-a constatat în boala lui Wilson o scădere a aminoacizilor din sînge (cistina, leucina, alanina, histidina, lizina, serina, arginina, valina, glicocolul, acidul glutamic şi treonina). S-a stabilit o corelaţie între variaţiile aminoacizilor liberi din sînge şi acelea ale ceruloplasminei şi cuprului.

N. Luţă-Moldoveanu

1544. FODOR D., MUNTEANU P. şi MARIN FL., *Explorarea dinamicii secretoare de acid clorhidric a stomacului şi a pepsinogenului pentru diagnosticul bolii ulceroase.* Med. int., 1962, **XIV**, *6*, 659—665.

Cercetarea dinamicii secretoare de ac. clorhidric a stomacului constituie un mijloc auxiliar preţios pentru diagnosticul pozitiv al ulcerului duodenal (chiar din faza preulceroasă) şi pentru diagnosticul diferenţial faţă de alte suferinţe dispeptice, cu simptomatologie clinică similară. Cercetarea uropepsinogenuriei are o valoare mai redusă, deoarece valorile obţinute variază în limite largi.

C. Şelariu

1545. VÎNTU A., VASILESCU-NAN F. şi TACORIAN S., *Contribuţii la studiul variaţiei distribuţiei aminoacizilor din ser în hepatitele cronice.* Med. int., 1962, **XIV**, *6*, 741—749.

Prin metoda cromatografică s-au constatat următoarele : a) un paralelism între proteinogramă, bromsulfonftaleină, teste de coagulare şi valorile aminoacizilor totali ; b) valorile aminoacidemiei totale au fost crescute la 64 % din cazuri ; c) aproape în toate cazurile au crescut valorile pentru tirozină, α-alanină, metionină şi arginină.

C. Şelariu

1546. PĂUNESCU C., SEROPIAN E., COMOROŞAN S., OANCEA R., SORIN E., SAFIRESCU GH., PANAITESCU GH., ŞOIMU I., GRECEANU I. şi CÎRJE M., *Aspecte clinice şi biochimice în ateroscleroza la tineri.* Med. int., 1962, **XIV**, *8*, 937—944.

Modificarea biochimică cea mai importantă este creşterea colesterolului liber al β-lipoproteinelor, deoarece acesta este crescut în 78,5 % din cazuri la bolnavii tineri şi în 100 % din cazuri la bolnavii bătrîni. Această creştere este foarte adesea întovărăşită de o modificare patologică a raportului între colesterolul esterificat şi colesterolul total al β-lipoproteinelor (56,2 % din cazuri) şi de o reacţie Kunkel pozitivă (50 % din cazuri).

C. Şelariu

1547. BUŞILĂ T. V., CRIŞAN G. I., CRIŞAN I. şi MAAGER P., *Contribuţii la diagnosticul diferenţial de laborator al icterelor obstructive.* Med. int., 1962, **XIV**, *8*, 959—968.

Se prezintă observaţiile clinice asupra valorii pe care o are pentru diagnosticul diferenţial testul Jirgl, efectuat simultan cu determinările de colesterolemie, de fosfatază alcalină, de bilirubină directă şi indirectă, de floculaţie timolică şi de aldolază. Se constată că testul Jirgl este pozitiv la 97 % din cazurile de ictere obstructive, fără leziuni hepatice degenerative ; o dată cu apariţia acestora, testul se negativează.

C. Şelariu

1548. TORJESCU V., PÎRVU D., CEAUŞU E., PARASCHIV D. şi CALOTĂ M., *Reacţia polipeptidazelor serice în hepatita epidemică.* Med. int. 1962, **XIV**, *8*, 969—975.

S-a studiat polipeptidaza serică comparativ cu alte enzime citolitice (transaminazele oxalacetice şi piruvice, aldolaza şi fosfohexozizomeraza) şi s-a constatat că polipeptidaza creşte mult în primele două săptămîni, revenind la normal după a patra săptămînă de boală. Modificările peptidazice sînt mai fidele şi mai precoce decît testele de disproteinemie, dar mai puţin utile în diagnosticul hepatitei epidemice decît valorile celorlalte enzime dozate.

C. Şelariu

1549. DRĂGAN M., *Contribuții la studiul histochimic al fosfolipidelor din elementele sangvine și medulare.* Morfol. norm. pat., 1962, *1*, 47–52.

Se pune în evidență, cu ajutorul unei modificări a metodei Baker, aplicabilă la frotiuri, prezența, localizarea și variațiile fosfolipidelor din leucocite, hematii și trombocite. Variațiile fosfolipidelor ar putea servi ca test în diferite afecțiuni ce provin din turburări ale metabolismului lipidic.

D. Cotariu

1550. PINELES S. și GRIGORESCU ȘT., *Date experimentale privind acțiunea substanțelor radioprotectoare asupra evacuării gastrice.* Oncol., radiol., 1962, **I**, *1*, 35–40.

S-a constatat că substanțe radioprotectoare care își exercită efectul prin mecanisme diferite asupra metabolismului (cisteamină, AET, adrenalină, α-cloraloză, clorpromazină, hormon corticohipofizar, albastru tripan) au o acțiune inhibitorie asupra evacuării gastrice. Aceste rezultate pledează în favoarea ipotezei autorilor, că radioprotecția nu poate fi obținută fără participarea sistemului nervos.

M. Furnică

1551. VOICULEȚ N., DRAGON V., TRESTIOREANU AL., POPOVICI O., BUNESCU U. și DUȚU R., *Diagnosticul tumorilor glandei mamare cu ajutorul radiofosforului.* Oncol., radiol., 1962, **I**, *3*, 255–260.

Plecînd de la faptul că țesuturile în creștere rapidă încorporează o cantitate mai mare de fosfor, s-a urmărit pe un grup de 53 bolnave cu tumori de sîn încorporarea ^{32}P în funcție de caracterul histologic al tumorii. Pe 33 cazuri cu tumori maligne s-a constatat o creștere a fixării ^{32}P la 82% din cazuri. La 20 bolnave cu tumori benigne, indicele de fixare a ^{32}P prezintă valori scăzute, rezultatele confirmîndu-se în proporție de 100%.

M. Furnică

1552. HURMUZACHE E., BĂRBUȚĂ R., HAIMOVICI M., TRIFAN E., APOSTOL S., NEGRESCU V., BATCU AL. și ARGINTARU G., *Metode comparative de tratament în distrofia sugarului și eficiența lor asupra unor fracțiuni proteice ale sîngelui.* Pediatria, 1962, **XI**, *1*, 83–89.

Proteinogramele la distrofici prezintă o scădere a serinelor, cu creșterea tuturor fracțiunilor globulinice. După tratament, prin regim igieno-dietetic singur sau asociat cu vitamină B_{12} sau testosteron, serinele se mențin scăzute și β-globulinele crescute, iar α_1-, α_2- și γ-globulinele scad.

S. Mihăescu

1553. CONSTANTINESCU C., RĂZVAN B., RĂDULESCU N., CHIVULESCU N., LESCOVAR A., IACOB C., RUSNAC E., RUSNAC D., CIGHIR R. şi IZVORANU M., *Aspecte ale electroforezei proteinelor sangvine în cursul unor boli cronice ale copilăriei.* Pediatria, 1962, **XI**, *4*, 317—325.

Se analizează modificările tabloului proteic sangvin şi semnificaţia lor în raport cu forma clinică, pe baza datelor furnizate de studiul electroforetic şi alte examene de laborator corespunzătoare bolii. Studiul s-a făcut în dinamică, atît pentru o internare, cît şi în decursul a două sau trei internări.

S. Mihăescu

1554. MARMOR I., RÁCZ T. şI SZABÓ I., *Contribuţii la studiul tulburării metabolismului hidromineral la sugari şi copii. Determinarea cationilor în hematii.* Pediatria, 1962, **XI**, *4*, 333—338.

S-au făcut determinări de cationi în hematii şi plasmă, la fotometrul cu flacără, în bronhopneumonii şi meningoencefalite. Se constată că variaţiile K în organism sînt reflectate mai fidel de K globular decît de cel plasmatic. De asemenea, concentraţia cationilor globulari este necesară pentru completarea ionogramei, dînd indicaţii preţioase în terapia stărilor grave.

S. Mihăescu

1555. ENESCU I. şi BABEI E., *Valoarea probelor de laborator în diagnosticul insuficienţei coronariene difuze.* Viaţa med., 1962, **IX**, *16*, 913—919.

Se discută valoarea diagnostică a examenului electrocardiografic, ca şi a unor examene de laborator cum sînt : colesterolemia, lipido- şi proteinograma, testul Kunkel şi lipidele sangvine totale.

D. Moţet-Grigoraş

XI. BIOCHIMIA NUTRIŢIEI

1556. BURUIANĂ L. M., VARACHIU N., DIACONESCU C., DEMA A. şi PASCU T., *Modificări biochimice provocate de introducerea porumbului însilozat în alimentaţia vacilor.* Lucr. şt. Inst. Agr. „N. Bălcescu", seria C, 1961, **V**, 415—419.

Introducerea porumbului însilozat în hrana vacilor provoacă o creştere a corpilor cetonici din sînge, o creştere a grăsimii din lapte, o încorporare crescută a lizinei în proteinele laptelui şi o scădere a proteinelor din lapte Aceste modificări sînt trecătoare şi analoge cu acelea provocate de hipersecreţia glucocorticoizilor.

H. Filipescu

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ

1557. HULPOI A., VINTILĂ M. şi VÎNTU O., *Cercetări asupra însilozării lucernei şi trifoiului cu bacterii acidolactice şi alte adaosuri.* Lucr. şt. Centr. exp. îngr. bact., 1960, **III**, 247—258.

Însilozarea lucernei şi a trifoiului prin adaos de substanţe bogate în glucide şi îndeosebi, prin folosirea combinată a acestora cu culturi de bacterii acidolactice (Lactolactirin) a conservat substanţele proteice aproape de valoarea procentuală iniţială. Folosirea acizilor minerali la conservarea acestor nutreţuri, deşi a coborît pH-ul masei însilozate cu 4—4,2, nu a inhibat complet procesele de putrefacţie.

H. Filipescu

1558. CALANCEA L. şi MOSOLOVA L., *Cercetări comparative cu privire la utilizarea clorurei de amoniu şi a ureei la însilozarea cocenilor uscaţi de porumb.* Lucr. şt. Inst. Agr. „Dr. P. Groza" Cluj, **XVII**, 297—303 (fără anul apariţiei).

Folosirea clorurii de amoniu (2%) la însilozarea cocenilor de porumb uscaţi a stimulat mai bine fermentaţia lactică şi sinteza proteinei, în comparaţie cu ureea aplicată în aceeaşi doză. Folosirea sulfului elementar, singur sau în amestec cu clorura de amoniu, a favorizat de asemenea procesul de sinteză a proteinei.

H. Filipescu

XIII. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

1559. MARCU C., MANOLESCU E., MANUCHIAN M., GANE P., DOBRESCU D., ŞTEFLEA D. şi BRATU V., *Acţiunea farmacodinamică a rotundinului. Nota II. Acţiunea neuro-sedativă.* Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *2*, 217—227.

Studiind efectele alcaloidului rotundin asupra diferitelor etaje ale sistemului nervos central, autorii constată că produsul posedă o acţiune neuro-sedativă, potenţează narcoza, scade motilitatea spontană a animalelor de experienţă, are efecte miorelaxante şi micşorează capacitatea de fixare a reflexelor condiţionate. Substanţa este de 3—4 ori mai puţin activă decît clorpromazinul şi are o toxicitate mai mică decît acesta.

H. D. Schell

1560. ABABEI L., *Aspecte din metabolismul glutaminei şi nucleotidelor în ficat şi creier de şoareci intoxicaţi cu CCl_4.* Studii şi cercet. fiziol.,1962, **VII**, *2*, 263—268.

La două ore după injectarea de CCl_4 se observă o scădere a nucleotidelor cu optimul de extincţie la 260 m μ, o scădere a glutaminazei şi a capacităţii respiratorii, atît la creier cît şi la ficat, cu o tendinţă de revenire după 48 ore. După injectarea CCl_4, efectul cunoscut al 2,4 DNP-

ului asupra țesutului normal dispare, din cauza decuplajului procesului de fosforilare oxidativă produs în prealabil de către CCl_4.

H. D. Schell

1561. TĂUTU P. și STĂNESCU L., *Date experimentale privind acțiunea antitumorală a unui nou derivat de azotiperită: morfolida acidului p-[bis (β-cloretil) amino] benzoic.* Oncol., radiol., 1962, I, *3*, 237—241.

Morfolida acidului p-[bis (β-cloretil) amino] benzoic sintetizată la Institutul oncologic București, a fost verificată pentru acțiunea antitumorală pe 6 tipuri de tumori experimentale (sarcom Jensen, carcinom Guérin, sarcom 37, sarcom 180, carcinom ascitic Ehrlich, melanosarcom de hamster H 16). Substanța prezintă o importantă acțiune antitumorală, toxicitate redusă și un efect leucopenizant minim.

M. Furnică

REFLECŢII PE MARGINEA CONGRESULUI INTERNAŢIONAL DE ONCOLOGIE DE LA MOSCOVA

În a doua jumătate a lunii iulie 1962, numai la cîteva zile după Forumul Mondial al Păcii, după Congresul Omenirii, cum l-a numit „Contemporanul", Moscova a concentrat asupra sa, în Palatul Congreselor din străvechiul Kremlin, pentru a doua oară, dar pe un alt plan, privirile încărcate de speranţe ale milioanelor de oameni de pe suprafaţa globului.

În zilele de 22—28 iulie a avut loc în capitala Uniunii Sovietice un eveniment ştiinţific de însemnătate excepţională. Acolo s-a desfăşurat cel de-al VIII-lea Congres internaţional de oncologie, la care au participat 5 000 de savanţi şi medici din 70 de ţări.

Deschiderea şi închiderea festivă a Congresului au avut loc în Palatul Congreselor din Kremlin, iar lucrările pe secţii s-au desfăşurat în sălile vestitei Universităţi Lomonosov.

Timp de o săptămînă oamenii de ştiinţă, medicii, prezenţi la Congres, şi-au împărtăşit experienţa lor, au discutat teorii vechi şi noi, au comparat rezultatele obţinute *in vitro* cu cele obţinute pe şobolani şi pe iepuri şi chiar pe corpul omenesc în suferinţă.

În ritmul de 10 min pentru o comunicare şi simultan în 10 amfiteatre, cu un total de 800 comunicări selecţionate, s-a desfăşurat — cu filme documentare în culori şi diapozitive de sprijin — o bătălie dusă la scară mondială între o armată în halate albe, echipată cu ultramicroscoape şi microscoape electronice, cu seringi, bisturie, cu bombe de cobalt, cu acceleratoare de particule, cu izotopi radioactivi, cu citostatice, şi un inamic imperceptibil sau mai mulţi inamici care se camuflează în modul cel mai secret în celulă.

Despre progresele ştiinţei medicale oncologice a vorbit participanţilor — şi le-a insuflat încredere în mijloacele şi metodele moderne — şi *expoziţia de aparatură medicală*, sovietică şi străină, deschisă în ajunul Congresului. Într-o panoramă sinoptică s-au înfăţişat vizitatorilor cuceririle gîndirii tehnice contemporane în acest domeniu.

După cum sublinia în cuvîntul său inaugural academicianul N. N. Blochin, preşedintele Congresului, „cel de-al VIII-lea Congres este cea mai mare, cea mai reprezentativă reuniune a oamenilor de ştiinţă consacrată problemei cancerului".

Dacă cu ocazia Congresului omenirii cei 5 000 de congresişti, reprezentînd 120 de ţări, şi-au unit sentimentele şi speranţele în victoria voinţei lor de a crea o lume fără războaie, la fel acelaşi număr de congresişti, reprezentanţi a 70 ţări, s-au întrunit pentru a-şi uni eforturile, fără nici o rezervă, în scopul de a fortifica ofensiva contra unuia din cei mai mari duşmani ai omenirii, cancerul, acest flagel care seceră milioane de vieţi omeneşti. Două acţiuni nobile, două manifestări profund umane, care se completează în mod armonios, numai la interval de cîteva zile, în Moscova, capitala primului stat socialist.

★

După cum ne informează profesorul O. Barion, vicepreşedintele Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii, pe întreg globul pămîntesc mor anual 2 milioane de oameni şi se îmbolnăvesc de această boală anual 5 milioane de oameni.

În ţările civilizate, unde media duratei de viaţă este considerabil mărită, cancerul se plasează între cauzele mortalităţii generale pe locul doi, după bolile cardio-vasculare. Pe de altă parte, toate statisticile arată că frecvenţa îmbolnăvirilor şi a deceselor de afecţiuni canceroase a sporit în ultimii 20 ani, mai ales în localizările pulmonare, de peste 3 ori la bărbaţi şi de peste 2 ori la femei, faţă de perioada anterioară.

Această înmulţire a frecvenţei cancerului a făcut ca, exagerîndu-se importanţa acestui fenomen, să se afirme că de acum cancerul este „boala specifică timpurilor moderne". În realitate cancerul este cunoscut din cele mai îndepărtate vremuri. Examenul mumiilor faraonilor ne arată că regii Egiptului încă mureau de cancer. De altfel, multe din organismele vieţuitoare care nu au nimic cu civilizaţia secolului al XX-lea sînt atinse de această boală, care nu cruţă nici animalele sălbatice, nici insectele şi nici vegetalele. Astfel au putut fi descoperite plante atinse de cancer în minele de cărbuni, vechi de un milion de ani.

Cu ocazia Congresului s-au îmbogăţit foarte mult datele privind *epidemiologia cancerului* pe plan mondial, obţinîndu-se date chiar şi de la popoarele cele mai puţin dezvoltate, cum sînt cele din Kenya şi chiar din Noua Guinee.

Tocmai această mare răspîndire a bolii canceroase a impus cercetătorilor să-şi fixeze atenţia asupra ei, să cerceteze cauzele ei, ca şi mijloacele prin care să fie combătută. Faptul că savanţii de pe tot globul pămîntesc au consimţit ca întrunirea lor în Congres internaţional să aibă loc în Moscova constituie o mărturie a aprecierii eforturilor şi succeselor oamenilor de ştiinţă sovietici în acest domeniu.

*

Problemei cancerogenezei i-au fost consacrate discuţii speciale în secţii şi o conferinţă a omului de ştiinţă Alexander Haddow, care a sintetizat stadiul actual al etiopatogeniei acestei boli.

În primul rînd s-a afirmat încă o dată că *nu este vorba de o fatalitate*. Anumite coincidenţe de fapt au frapat imaginea şi, rău interpretate, au creat un fel de legendă. Astfel s-au considerat altădată anumite locuinţe drept „locuinţe cancerigene", în care locatarii erau condamnaţi, oarecum în mod inexorabil, de a face boala canceroasă. Familii întregi, din generaţie în generaţie, trăiau sub teama cancerizării. Se presupunea că în aceste case ar exista un magnetism terestru accentuat, care ar fi factorul cancerigen. De asemenea a fost incriminat şi factorul ereditar. În sprijinul acestei ipoteze se citează familia lui Napoleon, mort de cancer de stomac, cu tatăl său, cu 3 fraţi şi o soră toţi morţi de cancer. Cancerologii ne avertizează în privinţa aceasta că, de vreme ce mortalitatea canceroasă este mare, nu trebuie să ne mire că vom întîlni mai multe cazuri de tumori maligne într-o serie de familii.

Deci, în privinţa eredităţii, pînă în prezent nu posedăm fapte concrete, certe.

A fost dezbătut şi *rolul iritaţiei cronice*. Sub acest raport, autori japonezi au afirmat că în provocarea cancerului esofagian şi gastric ar avea rol ingerarea de alimente fierbinţi. În sprijinul acestei teorii se aduce faptul că, la unele populaţii din Asia, bărbaţii, care consumă mîncare de orez şi ceai fierbinte, fiind serviţi de femeie, fac mult mai frecvent cancer de esofag decît femeile care consumă mîncarea de orez rece. Dar această interpretare „sociologică" nu se potriveşte pentru alte populaţii, la care cancerul esofagian e frecvent la femei. Cu toate acestea, nu este exclus ca apariţia tumorii să fie datorită absorbţiei repetate de lichide şi alimente foarte calde, sau altor arsuri cronice provocate de diferite alimente.

Rolul etiopatogenic al unor *intoxicaţii cronice* prin mecanism cumulativ, susţinut cu foarte solide argumente de savantul sovietic L. M. Şabad, fiind sprijinit şi de I. L. Lipkin şi de N. S. Temkin, a fost larg dezbătut şi a suscitat interesul participanţilor. E vorba de acţiunea unor agenţi cancerigeni existenţi în mediul extern, de acţiunea blastomogenică a fumului de ţigaretă, a gudroanelor de huilă, a negrului de fum şi a unor hidrocarburi, ca de pildă 3,4-benzopirenul, care se formează prin distilarea combustibililor şi sînt împrăştiate în atmosferă de coşurile caselor şi ale întreprinderilor industriale sau prin gazele de eşapament ale automobilelor. Afumatul alimentelor, unele vopsele sau substanţe conservante sau aromatice introduse în alimente, insecticidele şi ierbicidele care pot ajunge în hrana omului o dată cu produsele agricole pot să producă o intoxicaţie cronică subclinică, avînd şi rol cancerigen.

Un imens material experimental dovedeşte că apariţia tumorii în aceste împrejurări depinde în mare măsură de doza în care se găseşte agentul blastomogenic. Cu cît acest agent se află în organism, într-o doză mai mică, cu atît se îmbolnăvesc mai puţini oameni sau animale, iar data îmbolnăvirii e împinsă mai spre bătrîneţe. Astfel prof. L. M. Şabad a stabilit că în fumul a 100 ţigarete există 1,6 miimi de miligram de benzopiren. Aceasta e, fără îndoială, foarte puţin, însă calculînd ceea ce un fumător mijlociu absoarbe în ritmul de 25 ţigarete pe zi, timp de 10 ani, vom obţine o cifră de 1,2 miligrame. Pînă la vîrsta de 60 ani un fumător a înghiţit astfel 5 mg benzopiren.

La prima vedere s-ar părea că această cantitate de otravă cancerigenă este foarte slabă, cu atît mai mult cu cît fumătorul mijlociu nu înghite toată cantitatea de fum. Există însă mai multe argumente ca să putem considera că 3—4 mg de benzopiren, absorbite în curs de 40 ani, reprezintă un adevărat pericol. Numeroase experienţe făcute cu hidrocarburi sintetice, pe animale, arată că este suficient să se facă badijonarea tegumentului cu cîteva zecimi de miligram, sau să se administreze injecţii, pentru a provoca cancer de piele, cancer de pulmon, cancer de vezică, cancer de splină.

În ce priveşte soarta substanţelor cancerigene pătrunse în organism, după părerea lui Truhant nu se poate conta pe eliminarea lor treptată, cum se întîmplă cu alte substanţe toxice ingerate, ci mai de grabă este vorba de o acţiune permanentă şi ireversibilă, de o însumare a tuturor dozelor ingerate.

Cît priveşte rolul benzopirenului din aerul atmosferic viciat, tot prof. L.M. Şabad a adus cele mai solide argumente. Astfel s-a putut stabili, încă în anul 1955, că în oraşul Mukaveka, din Donbas, din cauza unei fabrici care polua aerul atmosferic, substanţele cancerigene s-au găsit într-o concentraţie de 100 de ori mai mare decît în aerul atmosferic al Leningradului.

Tot sub conducerea prof. L. M. Şabad s-au mai întreprins cercetări comparative în două oraşe siberiene situate la 60 km distanţă unul de altul, şi anume în Irkutsk şi în Angarsk. În aceste oraşe s-a cercetat poluarea aerului prin analiza unui metru cub de zăpadă după 6 luni de iarnă. S-a putut constata, cu această ocazie, că la Irkutsk (vechi oraş industrial) minimum de poluare a aerului cu benzopiren e de trei ori mai important faţă de maximum de la Angarsk (oraş construit în condiţii moderne abia în anul 1947).

Acest din urmă oraş — un oraş ciupercă, care este o mîndrie a regimului sovietic — a fost construit după planuri ştiinţifice ; cetatea industrială şi cartierul de locuit sînt separate printr-un spaţiu verde, larg de 2—3 km, iar în uzine un sistem fixează gudronul din fum. Casele sînt încălzite şi alimentate cu apă caldă de întreprindere. Hornurile aici sînt foarte rare.

De altfel, cu benzopiren s-a reuşit să se provoace cancer experimental pe animale, introducînd benzopirenul şi alte hidrocarburi în traheea animalului. Pentru ca însă benzopirenul să se fixeze de bronhii, a fost nevoie ca această substanţă să se administreze în combinaţie cu tuş de China. S-a putut astfel provoca, la şobolani, un cancer pulmonar asemănător cu cancerul omului.

Rolul cancerigen al derivaţilor halogenaţi şi azoici ai hidrocarburilor a fost subliniat şi de alţi oameni de ştiinţă, ca Lacasagne (Franţa), Weisbürger (S.U.A.), Prodi (Italia), Green (Marea Britanie) şi alţii. Numeroase cercetări experimentale arată că agenţi chimici foarte variaţi încep prin a provoca răspunsuri biologice, în care mecanismele imunitare joacă un rol foarte mare.

La Congres a fost subliniat şi organotropismul substanţelor cancerigene. Ca exemplu s-a adus binecunoscutul cancer al căilor urinare, survenind la persoanele care lucrează cu anilină.

Pe baza acestei etiologii a cancerului se impune profilaxia igienică corespunzătoare. La Congres susţinătorii acestei profilaxii au fost prof. Şabad (U.R.S.S.) şi Hueper (S.U.A.).

Teoria virusală e împărtăşită de mult timp de numeroşi savanţi, în special de la descoperirea, făcută la începutul secolului actual, *că un filtrat inoculat la un animal a putut provoca cancer.* Experienţe s-au făcut pe găini şi chiar pe iepuri. O emulsie de tumoră trecută prin filtru, şi care nu poate să conţină nici celule canceroase şi nici microbi, a putut să transmită unei găini sănătoase „sarcomul lui Roux" de la o găină bolnavă.

Cercetările întreprinse în ultimii ani, dacă nu au putut să dovedească rolul virusului în cancerul uman, au dezvoltat mult mai departe ipoteza. Numeroase comunicări prezentate cu ocazia Congresului, şi cu deosebire aceea a savantului sovietic Zilber, evocă o imagine a mecanismului de cancerizare, pe care am putea să o reprezentăm, simplificînd-o în mod exagerat, astfel : virusul care a pătruns într-o celulă poate trăi în aceasta timp îndelungat fără să modifice ceva în funcţiunea ei, deci ca un parazit, dar acest virus se poate integra celulei, se poate lega de acizii nucleici ai celulei, datorită acţiunii unor agenţi exteriori cum sînt anumite iradiaţii, substanţe chimice numite cancerigene etc., transformînd astfel celula normală într-o celulă malignă, care se reproduce la nesfîrşit, dînd naştere unor noi celule care vor avea proprietatea de a se divide haotic.

După Zilber, partea „infecţiei virotice" este numai o parte a patologiei virale. Spre deosebire de biologia altor infecţii virale, în care distrugerea agentului patogen exogen pune capăt bolii şi boala se termină cu vindecarea individului atins, destinul virusului citoblastic este altul, din cauză că aici e alterată mecanica genetică a celulei, în sensul că aceasta primeşte sub acţiunea virusului proprietăţi noi, cu totul străine funcţiunii fiziologice normale a tulpinii celulare care i-a dat naştere. Rolul virusului s-a mărginit deci la provocarea unei noi entităţi celulare, al cărei destin nu mai depinde de prezenţa sa. Din acest moment agentul cauzal poate să dispară — şi de fapt în majoritatea cazurilor lucrurile stau aşa — boala provocată astfel evoluează pe cont propriu şi nu va mai avea nimic de-a face cu prima sa cauză.

Profesorul Zilber împinge mai departe analiza biologică a fenomenului : virusul poate acţiona fie ca ordonator al genelor proprii celulei afectate, şi în cazul acesta vom avea a face cu fenomenul *mutaţiei*, fie că se încorporează sistemului cromozomial al celulei, în care caz ar fi vorba de *hibridaţie*. Dar oricare ar fi eventualitatea acestui fenomen, aptitudinile celulei transformate nu sînt încă decît virtuale. Într-adevăr, aceste celule cîştigă o funcţie antigenică nouă şi pot să suscite, la gazdă, formarea de anticorpi specifici. În acest moment vor interveni mecanismele de imuno-selecţie : în populaţia de celule supuse acţiunii acestor anticorpi, un mare număr vor fi mortal atinse ; numai cîteva elemente vor fi victorioase în această probă.

Din această interpretare a fenomenelor de cancerizare s-au deschis de acum cîteva perspective. De altfel, cercetările fizico-chimice şi imunologice întreprinse şi pînă în prezent, au permis Congresului să facă inventarul primelor lucrări. Astfel : s-a reuşit să se transporte virusuri cunoscute (virusul lui Roux, al lui Eittner, virusul polioma etc.) altor specii şi chiar unor animale care pînă acum s-au arătat refractare acţiunii lor ; s-a reuşit să se schimbe tropismul electiv al anumitor virusuri, şi în special al virusului leucemiilor păsărilor şi roză-

toarelor; s-a reuşit disocierea componentelor antigenice ale virusurilor şi stabilirea raporturilor lor cu fenomenul „mascării".

Mai mulţi autori au reuşit să adapteze virusul lui Roux la mamifere (şobolan, şoarece, hamster, cobai, iepure). Totuşi, rezultate pozitive s-au obţinut numai pe animale nou-născute şi numai cu anumite tulpini de virus.

Stiopina (U.R.S.S.) pune problema biotropismului unui virus latent, reactivat prin inocularea unui virus nepatogen ca atare pentru o anumită specie.

Principalul susţinător al originii virotice a cancerului, prof. Zilber, a rezumat dezbaterile în felul următor: „Se poate afirma ca fiind de acum stabilit că acţiunea cel puţin a unora din factorii cancerigeni (radiaţii ionizante, substanţe chimice) se poate explica prin activarea virusului citoblastic latent sau prin crearea unor condiţii care le permit să-şi exercite efectele patogene. Studiul acestor condiţii este o sarcină urgentă şi trebuie să fie întreprins cît mai în grabă. Se stabilesc raporturi cantitative între reproducerea anumitor virusuri şi transformarea unor celule normale în celule neoplazice; şi, în sfîrşit, existenţa unor raporturi foarte strînse între acţiunea virusului şi vîrsta, genotipul şi funcţiunile hormonale ale organismului parazitat reprezintă o altă condiţie de cea mai mare importanţă".

Imunologia în cancer. Legată de etiologia virotică posibilă a cancerului, problema imunologiei a stat şi ea în centrul preocupărilor oamenilor de ştiinţă de la Congres.

Din lucrările Congresului s-a profilat posibilitatea aplicării metodelor imunologice în oncologie şi s-au indicat limitele interpretării pe care o putem da imunităţii în starea actuală a tehnicii noastre.

Şcoala profesorului Zilber s-a arătat a fi şi în această problemă pe primul plan al actualităţii. În laboratorul profesorului Zilber s-a reuşit să se prepare 6 antigene simplificate, care s-au dovedit strîns specifice propriei lor tulpini. Toate aceste constatări prezintă un neîndoielnic interes; ele luminează comportarea clinică a anumitor cancere: anticorpii ce se formează pentru un anumit tip de antigen pot bloca creşterea unui anumit număr de celule neoplazice, însă lasă intactă capacitatea proliferativă a acelor celule, a căror structură antigenică va fi diferită; acestea din urmă, prin mecanismul selecţiei imunologice, îşi vor continua deci dezvoltarea lor invadantă şi vor împiedica efectul terapeutic scontat.

Din aceste cercetări reiese că atît în ceea ce priveşte stabilirea etiologiei virotice a cancerului, cît şi în ceea ce priveşte crearea unei imunităţi artificiale în cancer pe baza etiologiei lui virotice, oamenii de ştiinţă se află încă la mijloc de drum. Totuşi, rezultatele obţinute pînă la această oră ne dau speranţa că într-un viitor apropiat se va putea obţine un vaccin anticanceros, întocmai ca şi în poliomielită.

Celula canceroasă, cum este şi natural, a stat şi ea în preocuparea congresiştilor. Au fost prezentate lucrări privind structura celulei canceroase, posibilităţile de cultură a celulei canceroase şi enzimologia ei.

Microscopul fluorescent, microscopul electronic şi microscopul de contrast de fază au fost întrebuinţate în acest scop, şi pe o scară largă, în foarte multe laboratoare. S-au studiat organitele celulare (mitocondrii, aparatul lui Golgi, ergastoplasma, inclusiunile lipidice), ca şi formaţiunile de suprafaţă (membrana celulară, microvilozităţile). Contribuţii preţioase au adus Chentsov (U.R.S.S.), Lugano (Japonia), Terenteva (U.R.S.S.), Kunitcki (Polonia), Bertalanffy (Canada).

În ceea ce priveşte obţinerea de culturi, s-au pus speranţe în posibilitatea de a se realiza *culturi pure* de celule neoplazice, pe baza cărora apoi, ca într-o antibiogramă, s-ar putea verifica efectele citostaticelor. Dar, din cauza instabilităţii specificităţii celulare din cultura de ţesuturi

şi din cauză că în culturi nu se pot produce anticorpi, fapt demonstrat de Timofeevski (U.R.S.S.), unul din cei mai versaţi specialişti în această materie, metoda culturilor pure nu poate servi la testarea sperată a citostaticelor.

La problema enzimologiei celulei canceroase au adus o contribuţie preţioasă prof. Crăciun şi colaboratorii, care au studiat celula hepatică în cursul cancerizării experimentale. Ei au urmărit ciclul lui Krebs, ca şi fosfatazele şi aldolazele ; un studiu paralel s-a făcut prin metodele colorimetrice curente ale histochimiei. Autorii conchid că există o balansare între enzimele oxibiotice şi cele anoxibiotice, care furnizează energia necesară diviziunii celulare. Contribuţii preţioase au mai adus Wegmann (Franţa) şi Neifakh (U.R.S.S.).

Relaţiile gazdă-tumoră. În strînsă legătură cu studiul celulei canceroase şi cu etiologia ei, la Congres a fost larg dezbătută şi problema relaţiilor gazdă-tumoră. După Kavetski (U.R.S.S.), relaţiile gazdă-tumoră trebuie căutate în interreacţia metabolică, imunobiologică şi neurohormonală a tumorii şi a organismului bolnav. El insistă asupra importanţei comportării ţesutului conjunctiv în ansamblul său, producerea anticorpilor nefiind decît una din funcţiunile acestui sistem. Autorul semnalează că la începutul invaziei neoplazice se manifestă o activitate crescută în răspunsul enzimatic al ţesutului conjunctiv, al cărui conţinut în antihialuronidază serică poate servi drept test. Progresiv această barieră defensivă se topeşte, astfel că în cancerul avansat prăbuşirea acestei enzime este foarte severă. Reflectivitatea nervoasă, după Kavetski, este un factor esenţial în relaţiile gazdă-tumoră. Această reflectivitate urmează răspunsurile date prin sistemul nervos central la excitaţiile care îi parvin din cancer. De asemenea echilibrul steranelor sau rolul cuplului hipofiză-suprarenală sînt adesea perturbate, atît în cancerul experimental cît şi în cancerul uman. Aceeaşi concepţie a fost exprimată, sub o altă formă, şi de Denoix (Franţa), care a insistat şi asupra evoluţiei discontinue a cancerului uman, ceea ce denotă o instabilitate periodică între gazdă şi tumoră.

Acestea sînt contribuţiile din ultimul timp ale oamenilor de ştiinţă în problema etiopatogeniei, a cancerogenezei tumorilor maligne.

Deşi cu această ocazie s-au înregistrat progrese, dezbaterile rămîn deschise. Este însă verosimil — şi Congresul a adus numeroase argumente care afirmă această teză — că nu există o cauză unică a apariţiei cancerului, ci foarte probabil o însumare a mai multor factori suscită apariţia cancerului, e probabilă acţiunea simultană a unui virus, a unei substanţe chimice, a unei iradiaţii etc.

Poziţia oamenilor de ştiinţă sovietici în acest sector de cercetări s-a dovedit a fi deosebit de solidă şi pe merit apreciată.

De altfel, graţie perfecţionării mijloacelor de investigaţie ca microscopul electronic, acceleratoarele de particule, studiul enzimelor, studiul biologiei celulei canceroase etc., laboratoarele vor putea descoperi într-o zi mecanismele fenomenelor şi, în consecinţă, ne vor da armele prin care această boală va putea fi prevenită, respectiv combătută. În acest sens optimismul savanţilor de pretutindeni a fost unanim.

★

Conceptul actual asupra cancerului. În privinţa conceptului asupra maladiei canceroase, care mai pînă ieri considera cancerul ca un parazit al organismului, dezvoltîndu-se autonom şi unilateral, la Congres s-a emis ipoteza, susţinută de Kavetsky (U.R.S.S.), Koprovski (S.U.A.), Denoix (Franţa), Furth (S.U.A.), că boala canceroasă trebuie considerată ca un rezultat al unei veritabile opoziţii între potenţialul agresiv al bolii şi mijloacele de apărare pe care organismul le pune în joc pentru a o combate. Aceste mijloace de apărare sînt uneori reduse la maximum, explicînd malignitatea aparentă particulară unor tumori canceroase. Ele sînt uneori dezvoltate la un înalt grad, făcîndu-ne să înţelegem cît de încetinită poate fi, în unele împrejurări, evoluţia

cancerului. Există deci o interacţiune „gazdă-tumoră" şi se poate afirma că actualmente acest concept e admis pe scară universală.

El e bogat în consecinţe, atît pe plan clinic cît şi pe plan terapeutic, pentru că ne permite să privim evoluţia cancerului ca un rezultat al unui echilibru între două forţe simultane prezente, şi putem fi îndreptaţi să modificăm acest echilibru nu numai deprimînd pe una din ele (de exemplu prin radiaţii sau chimioterapie), ci de asemenea exaltînd-o pe cealaltă (de exemplu prin modificarea climatului hormonal sau prin procedee imunologice).

★

Studiul clinic al cancerului, pe foarte variatele lui localizări, a constituit de asemenea un obiect de discuţii în secţiile Congresului. Totuşi, neputînd cuprinde toate localizările, la Congres discuţiile s-au limitat cu deosebire la localizările digestive, pulmonară şi uterină.

Referitor la cancerul gastric, Boyadjian (U.R.S.S.) a prezentat posibilitatea de a se verifica operabilitatea acestei localizări prin splenoportografie, ca şi prin tomografii făcute în plan frontal, pe bolnavul la care s-a instituit un pneumoperitoneu sau retropneumoperitoneu. Autorii sovietici recurg în mod sistematic la ajutorul gastroscopiei şi a gastrobiopsiei.

În cancerul rectal, în U.R.S.S. supravieţuirile sînt de 56% la 3 ani, de 40% la 5 ani şi de 20% la 10 ani. Autorul sovietic Nisnevitsch, asociind sarcolizina, respectiv spiradisina, etilamina, aurantina sau ornaina, a obţinut rezultate foarte satisfăcătoare chiar şi în cazurile operate paliativ.

În cancerul pulmonar, Cervinsky (U.R.S.S.) practică în mod curent azigografia, alături de angiografia pulmonară, de pneumomediastinografie şi de examenele endoscopice, pentru a determina operabilitatea. În Institutul de oncologie Hertzen din Moscova se face sistematic explorarea funcţională preoperatorie a bolnavilor suferinzi de cancer pulmonar, în care scop se aplică electrokymografia condiţiilor de circulaţie pulmonară şi de ventilaţie pulmonară, putîndu-se, la nevoie, să se aprecieze separat aceste condiţii pentru fiecare lob pulmonar în parte.

Goldenberg (R.P.R.) a insistat asupra frecvenţei (30%) formelor simulînd pneumopatia acută ; el a studiat factorii care pot să influenţeze tabloul clinic şi radiologic în acest sens.

În cancerul genital la femei s-a insistat asupra stărilor precanceroase, asupra stadiului „O" (cancer *in situ*) şi asupra frecvenţei invaziei ganglionare extinse, acest din urmă fapt necesitînd explicarea exerezelor lărgite. Foarte multe filme documentare au susţinut problema cancerului genital, privind atît patologia cît şi terapeutica lui radicală.

★

Problema tratamentului, cum este şi natural, a preocupat un număr mare de comunicatori. S-au discutat metodele de tratament, indicaţiile lor şi rezultatele obţinute.

— *Tratamentul chirurgical* a dominat scena, atît în comunicări cît şi la vizionarea de filme. S-a insistat asupra precocităţii aplicării lui, ca şi asupra necesităţii de a se adînci radicalitatea tehnicilor aplicate. Pentru prima dată s-a auzit despre intervenţii eficace în cazuri de cancer în stadiu avansat.

— *În domeniul terapeuticii cu radiaţii*, majoritatea rapoartelor au pledat pentru nevoia supervoltajului. Introducerea radiaţiilor de înaltă tensiune, care are o vechime de 7—8 ani, a permis progrese tehnice foarte importante. În numeroase localizări ale cancerului, şi în special în cancerele localizate la nivelul extremităţii cefalice şi a gîtului, în acelea ale colului uterin, ale sînului, terapia de supravoltaj a ameliorat foarte mult rezultatele. Pe această linie e posibil să

se facă progrese, dar cu condiţia ca radiobiologia să fie mai bine cunoscută. Este nevoie, după Tubiana (Franţa), să se cunoască mai bine radiosensibilitatea atît a ţesuturilor sănătoase cît şi a celor canceroase. Autotransplantarea măduvei osoase conservate, recoltată de la bolnavă înainte de iradiere, după Strelin (U.R.S.S.) şi Costăchel (R.P.R.), constituie un preţios mijloc de protecţie a organismului contra razelor.

În problema radiobiologiei, a cărei cunoaştere este o condiţie preliminară esenţială pentru aplicarea eficace a radioterapiei, au prezentat la Congres cercetări valoroase Craievski (U.R.S.S.), Petrova (U.R.S.S.), Lacasagne (Franţa) şi Lebedeva (U.R.S.S.).

— *Chimioterapia cancerului este în plină dezvoltare.* În foarte multe ţări se fac cercetări cu citostatice, pentru lămurirea acţiunii lor, ca şi pentru ameliorarea eficienţei lor.

Astfel, autorii maghiari L. Varga şi T. Horvath au ajuns la concluzia că numai substanţele care au proprietatea de a se fixa pe suprafaţa enzimelor pot frîna creşterea tumorilor. D-Manitolul are această proprietate.

D. Martin (S.U.A.) a ajuns la concluzia că substanţele chimioterapeutice nu au acţiune atunci cînd mecanismele de apărare ale „gazdei" sînt blocate.

Acad. Milcu şi colaboratori (R.P.R.) de o parte şi A. Roy (India) de altă parte au preconizat asociaţia citostaticelor cu extrase hormonale, obţinînd astfel combinaţii noi, mai puţin toxice şi care acţionează mai puţin asupra sîngelui şi a parenchimelor ; bolnavii trataţi cu aceste substanţe noi prezintă o evidentă ameliorare, subiectivă şi obiectivă.

N. Fedorov, I. Zaretkivi, V. Rescikov au aplicat în tratamentul leucemiilor organoterapia, făcînd transplant de măduvă şi considerînd acest mijloc drept o verigă importantă în terapia complexă a tumorilor.

V. Timakov, D. Goldfarb, I. Domicer au verificat pe cale experimentală acţiunea biologică a 28 de preparate citostatice, sub aspectul acţiunii antifage, antibacteriale, precum şi gradul lor de activitate mutagenă, ajungînd la concluzia că cea mai puternică acţiune antitumorală au dovedit-o preparatele cu vădit efect antifag şi mutagen.

N. Ross (Anglia) a putut constata pe animale că adaosul de glucoză la preparatele citostatice sporeşte acţiunea preparatelor chimice.

În privinţa studiului mijloacelor terapeutice anticanceroase, prof. Larionov a subliniat necesitatea studiului proceselor intime ce au loc în celula canceroasă, urmărindu-se astfel înţelegerea lor. Cunoscînd procesele intime din celulă, metodele de tratament vor fi mai sigure, durata tratamentului se va reduce.

De altfel, pentru a înlesni accesul citostaticelor la organul, respectiv segmentul îmbolnăvit de cancer, în U.R.S.S. se practică pe scară întinsă administrarea citostaticelor pe calea circulaţiei regionale extravorporeale, cu deosebire cînd e vorba să fie atacat sarcomul, tendinţă care de altfel se observă şi la chirurgii din S.U.A. (Rocklin, Kaprovski). În aceste cazuri chimioterapia intervine simultan cu chirurgia, iar doza de citostatice poate fi masivă.

Pentru a proteja însă organismul de agresivitatea citostaticului, în aceste împrejurări conf. Costăchel, de la Institutul de oncologie, preconizează perfuzia de măduvă autologă.

De fapt, la Congres interesul faţă de chimioterapie a fost evident. Au fost prezentate preparate noi (sarcolizina şi aurantina în U.R.S.S., „5 Floruracil" în S.U.A.), s-au expus experienţele ce se efectuează în China cu compuşi de antimoniu, în R.P. Ungară cu extrase din diferite plante, în R.P.R. cu substanţe pe bază de hormoni, în Franţa cu substanţe dintr-o grupă de fenoli. În prezent, după cum a conchis prof. Vermel (U.R.S.S.), terapeutica chimică dispune de circa 30 de substanţe anticanceroase. Este mult, dar şi puţin, aceasta din urmă pentru motivul că fiecare din aceste medicamente este eficace numai asupra anumitor formaţiuni tumorale

Asocierea radiochirurgicală ca şi asocierea mai multor metode (chirurgie, radiaţii şi chimioterapie), au fost susţinute la Congres de experienţa unor eminenţi chirurgi ca A. Savinîh (U.R.S.S.), M. Margottini (Italia), E. Levisohn (S.U.A.), M. Tubiana (Franţa) ş.a.

De altfel, din dezbaterile Congresului a rezultat că medicina dispune de pe acum de un considerabil arsenal de mijloace pentru un tratament eficace. Totuşi, această problemă vitală nu poate fi soluţionată fără progresul ştiinţei medicale în strînsă legătură cu cuceririle biologiei, chimiei şi fizicii.

Dar soluţia combaterii cancerului nu trebuie căutată numai în metodele terapeutice, care se aplică doar după ce cancerul s-a ivit. Soluţia va fi găsită abia atunci cînd se va putea realiza profilaxia cancerului.

★

Profilaxia cancerului a avut o mare pondere în lucrările Congresului. Şcoala sovietică, în special, a putut să arate că în lupta anticanceroasă profilaxia constituie una din verigile cele mai importante.

Profilaxia cancerului are două căi principale de atac : lupta contra factorilor cancerigeni, sau „profilaxia igienică", şi depistarea stărilor precanceroase, sau „profilaxia clinică". Profesorul L. M. Şabad a arătat în raportul său şi mijloacele de luptă profilactică contra cancerului.

— *Profilaxia igienică vizează prevenirea acţiunii agenţilor cancerigeni asupra organismului,* în special a celor existenţi în mediul exterior. Astfel, prin modificarea condiţiilor de lucru, prin introducerea tehnologiei noi, a măsurilor de protecţie şi igienă, s-a ajuns ca de pe acum să nu se mai întîlnească cancerul hornarilor, cancerul radiologilor şi alte cîteva forme de cancer profesional. Lupta anticanceroasă, după prof. L. M. Şabad, trebuie să cuprindă şi unele produse ale industriei chimice, fie că sînt de domeniul industrial, fie că intră în viaţa de toate zilele : gudronul de huilă, negrul de fum, fumul de la case şi din întreprinderile industriale, fumul gazelor de eşapament, fumul din afumături (fumul în general fiind nociv prin benzopirenul pe care-l conţine, substanţă prin excelenţă cancerigenă) ; substanţe colorante şi conservante adăugate alimentelor ; insecticidele şi ierbicidele care pot să fie îngerate cu alimentele.

Îndepărtarea acestor noxe a arătat de pe acum marea importanţă a profilaxiei igienice (profesionale, comunale şi alimentare), după cum reiese şi din datele amintite anterior la capitolul etiologiei. Profilaxia igienică necesită măsuri de protecţie a igienei personale, precum şi măsuri speciale pe linie de stat şi de tehnologie. Pe această linie oncologia experimentală, care s-a născut din observaţii practice asupra afecţiunilor maligne determinate de un mediu dăunător la locul de producţie, e în măsură să contribuie în mod practic la ocrotirea sănătăţii, după cum a declarat profesorul L. M. Şabad.

— *Profilaxia clinică* vizează depistarea şi tratamentul în timp util a aşa-numitor *stări precanceroase.* Aceste stări reprezintă o verigă intermediară între starea normală a ţesuturilor de o parte şi cancerul propriu-zis de altă parte. Deşi încă nu a putut fi clarificat modul de apariţie a cancerului pe baza stării precanceroase — dacă tumora se dezvoltă pe fondul anumitor modificări sau direct din acestea — practica a arătat totuşi că există un anumit potenţial cancerigen în toate stările precanceroase şi că, dacă depistarea şi îndepărtarea lor se face în timp util, incidenţa tumorilor maligne se reduce mult. Sub acest raport, statisticile prezentate de savanţii sovietici au arătat că examenele profilactice în masă efectuate în rîndurile populaţiei au permis să se depisteze şi să se vindece, în Uniunea Sovietică, bolnavii de cancer în stadiu incipient. Pe această linie au o deosebită importanţă examenele profilactice efectuate asupra

anumitor grupuri ale populaţiei, care sînt supuse unor influenţe cancerigene. Astfel profilaxia clinică a cancerului se îmbină cu profilaxia lui igienică.

În privinţa studiului clinic al stărilor precanceroase au prezentat studii valoroase Glazunov (U.R.S.S.) pentru stomac, Mikolash pentru organele genitale feminine, Rosner (Israel) pentru glanda mamară, Morgenroth (R.F.G.) pentru cavitatea bucală, Auerbach (S.U.A.) şi Svedja (R.S. Cehoslovacă) pentru cancerul bronho-pulmonar. Şi, în sfîrşit, sub raportul profilaxiei, la Congres s-a exprimat speranţa că într-un viitor apropiat se va putea aplica şi profilaxia biologică a cancerului. Astfel prof. Jean Maisin (Belgia), bazîndu-se pe experienţe proprii, ca şi pe acelea ale prof. Zilber (U.R.S.S.), a expus părerea că direcţia principală în oncologie trebuie să devină căutarea metodelor de creare a imunităţii împotriva cancerului.

*

Organizarea luptei anticanceroase în U.R.S.S. a constituit, pentru congresişti, un subiect foarte interesant. Ea vizează pe de o parte profilaxia tumorilor canceroase (igienică şi clinică), pe de altă parte depistarea stărilor canceroase în stadiile incipiente, aceasta din urmă contribuind la mărirea eficienţei tratamentelor curative, a celui chirurgical în special.

Despre modul de organizare a muncii profilactice în U.R.S.S. a vorbit prof. A. I. Serebrov, subliniind că în U.R.S.S. au loc cu regularitate examene în masă ale populaţiei, datorită cărora a putut fi redus simţitor numărul cazurilor de cancer avansat.

Trăsătura fundamentală a sistemului sovietic de măsuri pentru combaterea tumorilor maligne constă în aplicarea lor pe linie de stat, în gratuitatea şi accesibilitatea lor pentru toate categoriile de populaţie. Reţeaua de instituţii care înfăptuieşte în U.R.S.S. lupta împotriva cancerului funcţionează sub conducerea unitară a organelor de sănătate publică şi promovează, în activitatea sa, principiul de bază al medicinei sovietice : profilaxia. Acest principiu a căpătat în prezent o largă aplicaţie şi în practica luptei anticanceroase.

Conducerea luptei anticanceroase în U.R.S.S. este înfăptuită de Ministerul Sănătăţii, prin reţeaua de instituţii subordonate lui.

Conducerea ştiinţifică şi metodologică a reţelei e asigurată de cele 21 de institute oncologice specializate, avînd în subordine 239 de dispensare oncologice şi 2 000 de secţii de oncologie din spitale şi cabinete de oncologie, dispersate pe întreg teritoriul U.R.S.S.

Metoda de lucru a acestor instituţii este dispensarizarea, care înseamnă : depistarea stărilor precanceroase şi a cancerului în rîndul populaţiei, asigurarea asistenţei medicale a cazurilor depistate, ţinerea evidenţei bolnavilor neoplazici, urmărirea bolnavilor trataţi, înfăptuirea măsurilor cu caracter profilactic (organizarea examenelor profilactice în masă a populaţiei) propaganda sanitară.

După cum ne-a informat A. I. Serebrovn şi B. D. Kaufman, de la Institutul de oncologie din Leningrad al Academiei de ştiinţe medicale a U.R.S.S., amploarea măsurilor profilactice aplicate în U.R.S.S. poate fi ilustrată prin faptul că examenele profilactice din anul 1960 au cuprins un număr de 37 927 800 de persoane din populaţia adultă a ţării.

La populaţia care în mod sistematic a fost examinată profilactic a scăzut considerabil proporţia tumorilor maligne depistate.

Paralel cu munca de profilaxie a cancerului, în U.R.S.S. se desfăşoară în institutele de cercetări o intensă muncă ştiinţifică, cu o tematică privind profilaxia cancerului, muncă în care sînt antrenaţi specialişti de diferite profiluri.

De altfel, în afară de tematica profilactică, munca ştiinţifică vizează şi tematici care studiază etiologia, diagnosticul, tratamentul, studiul morbidităţii şi al mortalităţii prin tumori

maligne, planificarea şi coordonarea cercetărilor ştiinţifice oncologice şi pregătirea de cadre. Sub acest din urmă raport — al pregătirii de cadre — în U.R.S.S. există 10 catedre de oncologie care funcţionează pe lîngă institutele de perfecţionare în oncologie a medicilor.

Acest fel atît de cuprinzător de a privi lupta anticanceroasă a dobîndit aprecierea congresiştilor şi aceste măsuri profilactice s-au recomandat a fi aplicate în toate ţările.

Amploarea luptei anticanceroase în U.R.S.S. reiese şi din următoarele date :

În Uniunea Sovietică, pe lîngă ceea ce există, sînt în plan proiecte grandioase şi în ceea ce priveşte domeniul spitalicesc. Sînt în lucru şi nu peste mult timp vor fi deschise noi institute : Institutul de biofizică şi de cancerologie experimentală şi clinică din Moscova, Institutul de oncologie din Leningrad, din Kiev, din Minsk şi din Alma-Ata.

*

În cele ce urmează am mai vrea să arătăm că delegaţia ţării noastre a fost formată din 16 oameni de ştiinţă, profesori şi cercetători, reprezentanţi ai Academiei R.P.R., ai USSM-ului, Ministerului Sănătăţii şi Prevederilor Sociale şi Ministerului Învăţămîntului. De asemenea au participat la Congres, prin mijlocirea USSM-lui, peste 150 medici pe care îi interesau problemele oncologice.

Din partea delegaţiei ţării noastre au fost expuse 54 de lucrări ştiinţifice, ţara noastră fiind situată în această privinţă alături de Anglia, pe locul 4, înaintea Franţei.

Delegaţia noastră a adus sugestii foarte preţioase în ceea ce priveşte diagnosticul stării precanceroase, propunînd studierea şi depistarea acestor stări, în care scop consideră necesară elaborarea unei metodologii şi a unor instrucţiuni unitare, astfel încît să se întocmească o clasificare internaţională a stărilor precanceroase. Această idee a delegaţiei noastre a găsit confirmare şi sprijin şi în comunicarea chirurgului sovietic Nicolai Elanski.

De asemenea, în radiobiologie delegaţia ţării noastre a prezentat experienţa Institutului de oncologie din Bucureşti în ceea ce priveşte „acţiunea dozelor mari de radiaţii X asupra tumorilor maligne", pe bază de cercetări clinice şi experimentale.

După această prea sumară prezentare a activităţii delegaţiei noastre, mai trebuie să amintim că toate delegaţiile au avut posibilitatea ca în timpul Congresului, pe lîngă participarea la lucrările acestuia, să beneficieze şi de vizitarea instituţiilor ştiinţifice şi medicale sau să ia parte la excursiile organizate pentru membrii Congresului şi pentru persoanele care i-au însoţit.

În centrul atenţiei generale a stat vizitarea institutelor cu profil oncologic, numeroase (14 în total) şi foarte bine organizate şi dotate. În acelaşi timp s-a înlesnit vizitarea şi altor spitale, după dorinţa unora dintre participanţi.

Am vizitat Institutul de Urgenţe Sklifosovski, unde am asistat la intervenţii chirurgicale ; ni s-a demonstrat recoltarea sîngelui de la cadavre ; în laboratorul experimental s-a făcut o transplantare de inimă la un cîine şi am văzut un cîine operat cu 38 zile înainte şi în perfectă stare de sănătate. Ţinem şi pe această cale să mulţumim cordial profesorilor Petrov şi Arapov.

De asemenea am avut posibilitatea de a vizita Institutul de chirurgie cardiovasculară al Academiei de ştiinţe a U.R.S.S., condus de profesorul Kolesnikov, institut care numără 250 paturi şi care se bucură de un binemeritat renume, unde se pregătesc viitoarele cadre specializate în chirurgia cardiovasculară.

Am mai vizitat şi Clinica urologică condusă de prof. Pîtel, clinică care menţine un contact strîns cu serviciile noastre de specialitate.

Peste tot participanţii la Congres s-au bucurat de o primire foarte cordială şi atenţia organizatorilor s-a manifestat la fiecare pas.

*

Lucrările Congresului au arătat cu toată evidenţa că oncologia se află pe drumul unei dezvoltări fructuoase şi că milenara problemă a bolii canceroase va fi soluţionată în scurt timp. E de fapt principala concluzie la care au ajuns oncologii reuniţi la Moscova.

„În rezolvarea ei" — s-a spus în mesajul adresat congresului de către N. S. Hruşciov — „deosebit de importante sînt eforturile comune şi colaborarea internaţională a oamenilor de ştiinţă, şi nu numai a medicilor, ci a unui cerc larg de reprezentanţi ai altor ramuri ale ştiinţei. Una din condiţiile hotărîtoare ale succeselor în această operă, profund umanitară şi nobilă, în numele şi pentru binele omului, este munca paşnică, creatoare a oamenilor de ştiinţă, folosirea marilor descoperiri ale ştiinţei şi ale tehnicii, a uriaşelor resurse materiale, în scopuri paşnice".

Congresul de la Moscova a prilejuit oamenilor de ştiinţă, specialişti oncologi sau din ramuri anexe, un foarte valoros schimb de experienţă şi de păreri, pentru a lărgi şi a întări colaborarea în lupta contra cancerului, consolidînd astfel bazele organizatorice ale conlucrării savanţilor din lumea întreagă.

Congresul internaţional de oncologie de la Moscova a fost o manifestare ştiinţifică excelent organizată, o acţiune de mare anvergură, de mare importanţă, ce va stimula şi fortifica ofensiva generală contra cancerului. Spiritul care a dominat în tot timpul congresului a fost caracterizat prin colaborare creatoare, înţelegere reciprocă, unitate a ţelului. Prof. Alexander Haddow (Anglia), preşedintele nou ales a Uniunii internaţionale împotriva cancerului, spunea, pe bună dreptate, că „pacea în lumea întreagă depinde şi de asemenea acţiuni, cum a fost Congresul împotriva cancerului".

Prof. dr. I. Danicico şi conf. dr. I. Bulbuca,
Institutul medico-farmaceutic, Timişoara

LUCRĂRI ROMÎNEŞTI DE BIOCHIMIE, PREZENTATE LA AL VIII-lea CONGRES INTERNAŢIONAL DE ONCOLOGIE DE LA MOSCOVA

Între 22—28 iulie 1962 a avut loc la Moscova al VIII-lea Congres internaţional de oncologie. În cadrul Congresului, biochimia a constituit obiectul uneia din secţiunile principale de desfăşurare a lucrărilor.

Biochimia romînească a fost reprezentată la Congres prin acad. prof. Eug. Macovschi şi printr-o serie de cercetători din Institutul oncologic (I. Kiţulescu, A. Bandrovski, V. Băluţă, M. Furnică, N. Voiculeţ, G. Dinescu), Institutul „V. Babeş" (F. Moţoc), I.C.C.F. (I. Banu) etc.

Delegaţia romînă a prezentat un număr de 13 lucrări, dintre care 5 au fost comunicate iar 8 au fost depuse la Secretariatul Congresului. Toate lucrările au apărut în volumul de rezumate al Congresului.

Lucrările prezentate şi-au adus contribuţia atît în problemele teoretice ale biochimiei bolii canceroase, cît şi în probleme legate de activitatea clinică (chimioterapie, radiobiologie).

În cadrul secţiei de biochimie au fost comunicate următoarele lucrări :

1. Acad. prof. Eug. Macovschi, *Comportarea proteinelor serului sangvin normal şi canceros în condiţiile reacţiilor lente.*

Cu ajutorul unui aparat fotoelectric s-a cercetat mersul precipitării lente a proteinelor din serul sangvin diluat, sub acţiunea acidului sulfosalicilic, care difuza în ser dintr-un strat de alcool amilic. De asemenea, s-a urmărit în aceleaşi condiţii difuzia „verdelui acid" (Säuregrün) din alcool amilic în ser.

A mai fost cercetată modificarea viscozităţii serului sangvin sub acţiunea soluţiilor diluate de clorură mercurică.

Deosebirile constatate între comportarea serului normal şi a celui canceros indică existenţa unor deosebiri la nivelul substanţelor proteice respective.

2. E. C. Crăciun, F. Moţoc, L. Georgescu, S. Constantinescu (Inst. „V. Babeş", Bucureşti), *Modificări bioenzimatice şi histochimice în carcinogeneza hepatică experimentală.*

Autorii au studiat în faza de cancerizare a parenchimului hepatic modificările unor sisteme enzimatice (aldolaza, fosfataza acidă şi alcalină) şi alterările ciclului Krebs (dehidrogenaza succinică, malică, piruvică), constatînd o scădere a activităţii enzimelor anoxibiotice. Modificările biochimice în cursul diferitelor etape de cancerizare sînt legate de modificările structurale, histochimice şi morfopatologice. În faza incipientă a cancerizării deviaţiile biochimice sînt însoţite de o importantă acumulare de mucopolizaharide, care dispar complet în faza următoare.

3. A. Bandrovski, A. Dimitriu, V. Mudric (Inst. oncologic, Bucureşti), *Studiu asupra acizilor din ciclul Krebs în cancer.*

Plecînd de la experienţele lui Nordman, care a pus în evidenţă *in vivo* existenţa ciclului Krebs în metabolismul intermediar după aportul exogen al unui acid din ciclul tricarboxilic, s-a urmărit influenţa perfuziei de succinat de sodiu asupra eliminării acizilor din ciclul Krebs la bolnavii de cancer cu diferite localizări.

Acizii organici au fost separaţi pe coloane de răşini schimbătoare de ioni şi determinaţi ulterior prin metoda cromatografiei descendente bidimensionale.

S-au constatat următoarele : 1) la bolnavii cu cancer mamar emisia de acizi organici (şi în special a acizilor din ciclul Krebs) este întotdeauna superioară faţă de cea observată la persoanele sănătoase ; 2) la bolnavii cu neoplasmul sferei genitale se remarcă în special creşterea eliminării acidului α-cetoglutaric ; 3) în neoplasmul de rect modificările au loc imediat după perfuzia cu succinat ; 4) în cancerul gastric după perfuzia cu succinat apare caracteristică creşterea eliminării acidului izocitric.

4. G. Dinescu, I. Kiţulescu (Institutul oncologic, Bucureşti), *Activitatea acetilfosfatazei din tumori.*

Acetilfosfataza joacă rol în reglarea glicolizei şi respiraţiei şi participă la mecanismul celular de reglare a creşterii. În ţesuturile normale activitatea acetilfosfatazică

scade în ordinea : rinichi, mușchi scheletic, inimă, creier, ficat, splină, sînge. În tumori (Guérin, Walker, Yoshida) se constată o activitate mult crescută a acetilfosfatazei depășind cu 35—40% activitatea enzimei din mușchi.

Semnificația activității crescute a acetilfosfatazei din tumori este discutată în comparație cu activitatea scăzută a ATP-azei, presupunîndu-se că utilizarea activă a acetilfosfatului în țesutul neoplazic ar putea compensa utilizarea deficitară a ATP-ului de către țesutul canceros.

5. N. Voiculeț (Institutul oncologic, București), *Studiul grefei de măduvă osoasă și a activității eritropoietice a animalelor tratate cu doze mari de citostatice și perfuzie de măduvă osoasă autologă.*

S-a pus în evidență dispariția rapidă a radioactivității elementelor medulare marcate cu ^{51}Cr și administrate i.v., demonstrîndu-se retenția lor în spațiile lacunare ale organelor hematoformatoare. Sub acest aspect lucrarea aduce contribuții la mecanismul de acțiune al țesutului hematopoietic.

Pentru urmărirea eficacității grefei de măduvă, s-a pus în evidență cu ^{59}Fe restabilirea funcției organelor hematopoietice la bolnavii tratați cu citostatice. Folosind ca test coeficienții dinamici ai metabolismului intermediar al fierului s-a putut urmări gradul de lezare a funcției eritropoietice. Acest procedeu are valoare pentru clinicieni la stabilirea atitudinei terapeutice și alegerea momentului de aplicare a unei noi grefe medulare.

Au fost depuse următoarele lucrări :

1. I. Banu, E. Soru (I.C.C.F., București), *Acțiunea ribonucleazei și dezoxiribonucleazei asupra încorporării acidului L-glutamic-^{14}C în celulele carcinomatoase ascitice Ehrlich.*

Continuînd cercetările prin care s-a arătat că ribonucleaza și dezoxiribonucleaza exercită o acțiune inhibitorie asupra dezvoltării carcinomului Ehrlich, s-a urmărit acțiunea diferitelor concentrații ale acestor enzime asupra încorporării acidului L-glutamic marcat în proteinele tumorale, precum și conținutul în peptide, proteine și nucleotide. Aceste cercetări pun în evidență o serie de modificări legate de concentrația enzimelor care inhibă creșterea tumorală.

2. I. Kițulescu (Inst. oncologic, București), *Arsenoliza în sîngele uman canceros și necanceros.*

În sîngele recoltat pe oxalat de la bolnavi cancerоși și de la normali s-a studiat arsenoliza acetilfosfatului, substanță care rezultă în țesuturi din acetilcolină.

Arsenoliza este activă după 30 min la 37°C ; viteza de arsenoliză este proporțională cu concentrația CoA și depinde de cantitatea de sînge total, eritrocite sau plasmă utilizată. Arsenoliza este influențată de pH, activitatea maximă producîndu-se la pH alcalin (pH = 9). Arsenoliza în sînge este activată de adaosul de cantități mici de țesut (creier, ficat, rinichi, tumoră), producîndu-se după 5 min la temperatura camerei. Tumorile accelerează arsenoliza mai mult decît țesuturile normale.

3. V. Băluță, I. Kițulescu (Inst. oncologic, București), *Fructozo-1-6-difosfataza din ficatul animalelor purtătoare de tumoră.*

Activitatea fructozo-1-6-difosfatazei nu poate fi pusă în evidenţă în tumori. În ficatul animalelor cu tumori Walker sau Yoshida activitatea enzimei este mai scăzută decît în ficatul normal (25 % inhibiţie). *In vitro* adaosul de ţesut tumoral produce scăderea activităţii enzimei din ficat. Sarcolizina influenţează puternic activitatea fructozo-1-6-difosfatazei din ficatul animalelor necanceroase şi mult mai slab activitatea enzimei din ficatul animalelor normale.

4. F. Gyergyay, A. Antalffy, E. Gy. Malatinszky, P. Pap-Tuka, L. Schuller, L. Vincze (IMF., Tg. Mureş), *Studiu comparativ al acţiunii inhibiţiei metabolismului glucidic asupra regenerării fiziologice şi creşterii tumorale.*

Tulburînd metabolismul glucidic prin diverse mijloace NaCN, NaF, 2,4-dinitrofenol, $CH_2I-COOH$, presiune parţială redusă de oxigen se produce inhibiţia activităţii mitotice în ţesuturi normale (epiteliul intestinal, limbă, ficat în regenerare) cît şi în ţesuturi tumorale (tumori benzpirenice, subcutanate, ascitice Ehrlich, Guérin, Jensen). Dintre substanţele utilizate, NaF s-a dovedit a fi cea mai activă.

5. I. Chiricuţă, I. C. Gross, G. Simo, V. Popescu (Inst. oncologic, Cluj), *Studii asupra modificării activităţii catalazei hepatice în boala canceroasă.*
Studiul catalazei hepatice la bolnavii de cancer a arătat o scădere a activităţii acestei enzime în comparaţie cu activitatea celei din ficatul normal. Se observă revenirea la normal a activităţii catalazei hepatice la canceroşii operaţi radical.

La secţiile de chimioterapie şi radiobiologie au fost prezentate următoarele lucrări în biochimie :

1. E. Soru, I. Banu (Inst. Cantacuzino, Bucureşti), *Acţiunea dezoxiribonucleazei şi a ribonucleazei asupra dezvoltării carcinomului ascitic Ehrlich.*

S-a studiat această acţiune avînd drept criteriu coeficientul de inhibiţie a creşterii tumorale totale (adică partea celulară şi partea lichidă) şi a părţii celulare a aceleiaşi tumori. Se constată că efectul inhibitor al dezoxiribonucleazei se manifestă asupra părţii lichide a tumorilor ascitice şi în mai mică măsură asupra părţii celulare. Efectul inhibitor al ribonucleazei se manifestă asupra părţii celulare tumorale şi în mai mică măsură asupra părţii lichide a aceleiaşi tumori, deşi ambele enzime exercită un efect inhibitor asupra dezvoltării tumorii ascită.

2. N. Fabian, E. Pora, E. David, G. Simu, I. Chiricuţă (IMF, Cluj), *Modificări în boala canceroasă a grupărilor SH sub acţiunea radioterapiei.*

S-au urmărit grupările SH la pacienţi cu tumori maligne (carcinom cutanat şi de col uterin) în plasmă, urină şi tumoră, sub acţiunea radioterapiei. În plasma canceroşilor grupările SH libere scad în mod evident după aplicarea dozei totale de 5 000 r. Acelaşi lucru se constată cu grupările sulfhidrilice totale. În urină nu se constată modificarea grupărilor SH. Examenele chimice şi histochimice efectuate la nivelul tumorilor arată scăderea grupărilor SH în funcţie de modificările histologice ; ele reapar în citoplasma celulelor epiteliale regenerate, la sfîrşitul tratamentului.

3. M. Furnică, G. Furnică (Institutul oncologic, Bucureşti), *Participarea colinesterazei în mecanismul de radioprotecţie.*

Continuînd lucrările care demonstrează participarea sistemului nervos în producerea efectului radiobiologic şi în fenomenul de radioprotecţie, autorii ajung la concluzia că pentru protecţia organismului contra efectului nociv al radiaţiilor este nevoie de inhibiţia activităţii colinesterazei în timpul iradierii.

Lucrările prezentate la al VIII-lea Congres internaţional de oncologie (comunicate sau depuse) vor fi publicate in extenso în revista „Acta Unio Contra Cancrum".

M. Furnică,
cercetător principal,
Inst. oncologic, Bucureşti

POLAROGRAFIA ÎN CHIMIOTERAPIE, BIOCHIMIE ŞI BIOLOGIE
— Simpozion internaţional, Jena, 1962 —

Concepută acum 40 de ani de renumitul savant ceh J. Heyrovsky, laureat al Premiului Nobel, polarografia a cunoscut o impetuoasă dezvoltare atît ca metodă fizico-chimică de analiză cît şi, mai ales în ultimul timp, ca instrument de cercetare. Introdusă în majoritatea laboratoarelor moderne uzinale sau de cercetare propriu-zisă, polarografia aduce o contribuţie importantă la cunoaşterea, interpretarea şi rezolvarea multor probleme de chimie analitică, chimie fizică, chimie organică, biochimie şi biologie în general.

Ca urmare a acestei dezvoltări, precum şi pentru a dezbate unele probleme şi rezultate obţinute în diversele ramuri ale polarografiei, se organizează la anumite intervale de timp simpozioane internaţionale pe diferite teme. Astfel, între 13—15 septembrie 1962 a avut loc la Jena, sub auspiciile Academiei de Ştiinţe a R.D.G., simpozionul internaţional „Polarografia în chimioterapie, biochimie şi biologie". La această reuniune au participat aproximativ 160 de specialişti în polarografie din 17 ţări (Anglia, Austria, R.P. Bulgaria, R.S. Cehoslovacă, Danemarca, Franţa, R.D. Germană, R.F. Germană, Italia, Japonia, Olanda, R.P. Polonă, R.P. Romînă, S.U.A., Suedia, R.P. Ungară, U.R.S.S.). Ţara noastră a fost reprezentată la acest simpozion prin profesorul R. Ralea de la Universitatea din Iaşi şi M. Şerban, cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

Trebuie subliniat că importanţa ştiinţifică a acestui simpozion a fost determinată nu numai de tematica şi nivelul lucrărilor prezentate, ci şi de participarea unora dintre cele mai proeminente figuri ale polarografiei, ceea ce a contribuit, desigur, la înalta ţinută ştiinţifică a simpozionului.

Lucrările simpozionului au fost organizate în şapte secţii. În cadrul acestora s-au expus şi dezbătut aproximativ 90 de referate şi comunicări ştiinţifice originale. Acestea au abordat probleme legate de: polarografia depolarizatorilor cu greutate moleculară mică, urmărirea diferitelor reacţii pe cale polarografică, proprietăţile polarografice ale macromoleculelor şi monomerilor, cercetarea polarografică a proceselor metabolice, probleme de bază ale polarografiei (mecanisme şi metode). Chiar din această sumară prezentare a tematicei simpozionului apare evident că, în afara problemelor de chimioterapie, biochimie şi biologie, s-au prezentat şi dezbătut şi alte probleme din diferite domenii ale polarografiei, ceea ce subliniază cadrul larg al preocupărilor polarografice pe care şi l-a propus acest simpozion.

A expune şi a analiza, chiar în ansamblu, în cadrul unui articol sumar, aceste preocupări şi probleme, precum şi discuţiile care s-au purtat în jurul lor, este destul de dificil, date fiind atît varietatea domeniilor abordate, cît şi numărul mare de comunicări. Considerăm totuşi util să menţionăm, cu caracter informativ, cîteva din numeroasele comunicări interesante expuse la acest simpozion, şi anume : „Polarografia structurii terţiare a proteinelor şi enzimelor" (I. Ivanov şi colab., U.R.S.S.) ; „Relaţii între comportarea polarografică a hormonilor steroizi şi structura lor" (O. Hrdy, R.S. Cehoslovacă) ; „Contribuţii polarografice la studiul reacţiilor chimice şi biochimice ale unor vitamine din grupa B, K şi E" (E. Knobloch, R.S. Cehoslovacă) ; „Polarografia în foto-biochimie" (H. Berg, R.D.G.) ; „Rezultate noi în cromatopolarografie" (W. Kemula, R.P. Polonă) ; „Influenţa adsorbţiei unor substanţe organice asupra cineticii de reducere electrochimică" (G. Tedoradse şi colab., U.R.S.S.) ; „Electroliza oxidativă a virusurilor" (J. Hallum, S.U.A.) ; „Cercetări polarografice şi oscilopolarografice asupra degradării enzimatice a amidonului" (S. Rusznok, şi colab., R.P. Ungară) ; „Denaturarea acidului dezoxiribonucleic" (E. Palecek, R.S. Cehoslovacă) ; „Cinetica de electrod la reducerea polarografică a hidrocarburilor aromatice" (C. Büthker, Olanda) ; „Măsurarea polarografică a transportului şi utilizării oxigenului în ţesuturi" (I. Longmuir şi colab., Anglia) ; „Asupra capacităţii schimbate de reacţie a moleculelor în cadrul stratului dublu electric" (W. Kemula şi colab., R.P. Polonă) ; „Cercetarea polarografică a acţiunii reducătoare a microorganismelor" (H. Wagner, R.D.G.) ş.a.

Delegaţii romîni care au luat parte la lucrările simpozionului au prezentat comunicările : „Studiul polarografic şi oscilopolarografic al unor aminoacizi" (R. Ralea) şi „Relaţii între unele săruri cuaternare de amoniu cu activitate curarezantă şi reacţia catalitică a grupării tiol" (M. Şerban). Aceste comunicări au fost urmărite cu interes, fiind apreciate în cadrul discuţiilor purtate pe marginea lor.

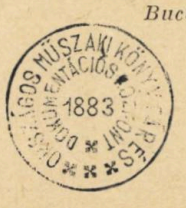
Materialele prezentate la simpozion au apărut, sub formă de rezumat, în „Zeitschrift für Chemie", vol. 2/1962, iar in extenso vor fi publicate în „Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin". La simpozion au fost prezentate de asemenea şi cîteva filme, avînd ca tematică diferite aspecte legate de partea experimentală a polarografiei.

Concluziile asupra problemelor dezbătute, ca şi schiţarea unor linii directoare de dezvoltare a cercetărilor în cîteva domenii ale polarografiei, au fost formulate în cadrul a trei discuţii generale, care s-au axat pe următoarele direcţii principale : a) posibilităţile polarografiei în problemele de constituţie şi mecanisme de reacţie ; b) posibilităţile polarografiei în cercetările biologice ; c) posibilităţile polarografiei în procesele de adsorbţie.

Menţionăm, în fine, că simpozionul de polarografie de la Jena a fost precedat de un curs internaţional de oscilopolarografie — ramură nouă şi de perspectivă a polarografiei clasice. Participanţii la acest curs au avut posibilitatea să urmărească, timp de 3 zile, o serie de prelegeri (susţinute de specialişti cehi) asupra problemelor de bază ale oscilopolarografiei şi ale aplicaţiilor sale, şi totodată să efectueze, în paralel, lucrări practice din domeniul chimiei analitice, chimiei organice, biochimiei şi farmaciei.

În concluzie, pe lîngă semnificaţia ştiinţifică deosebită a acestui simpozion internaţional care a marcat, o dată în plus, progresele realizate în polarografie şi perspectivele acestui domeniu, trebuie subliniate şi stabilirea unor contacte personale şi schimburi de vederi între participanţi, ceea ce, desigur, vor contribui la succesele viitoare ale polarografiei.

Mihail Şerban,
cercetător principal,
Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
Bucureşti



LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

T. NĂŞCUŢIU, **Cromatografia pe hîrtie a substanţelor anorganice**, 220 p. + 3 pl., 13,90 lei.

J. REICHEL, **Tehnologia coloranţilor antrachinonici**, 440 p. + 3 pl., 21,50 lei.

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut :

Anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
Anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
Anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
Anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei);
Anul V, 1962, 4 n-re (a 7 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare la

LIBRĂRIA ACADEMIEI R.P.R.

Bucureşti, Calea Victoriei nr. 27, sau la orice librărie ştiinţifică din ţară.

Se pot comanda şi prin poştă la Secţia „Cartea prin poştă" de pe lîngă Librăria Academiei R.P.R., sau la librăria

„CARTEA PRIN POŞTĂ"

Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie.

Abonamentele se fac la oficiile poştale, prin factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate, cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin Întreprinderea de stat pentru comerţul exterior „Cartimex", str. Aristide Briand nr. 14, sau căsuţa poştală 134–135, Bucureşti.

I. P. 2. c. 5695

Lei 7

F 1330

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

2
ANUL VI
1963

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

2

ANUL VI

1963

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUȘANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacție.*

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacția: BUCUREȘTI, Str. Popovici nr. 20
Tel. 18.43.55 — 17.79.63

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul VI, nr. 2 1963

SUMAR

Pag.

A. V. PALLADIN, Metabolismul proteic în creier în condiţiile hibernării . . 173
E. MACOVSCHI şi CORINA IORDACHE, Coeficienţii izometrici şi relaţiile dintre efort şi fosfagenul muscular 181
S. OERIU şi E. MÎRZA, Contribuţii la studiul corelaţiei biochimice dintre vîrstă şi ateroscleroză 201
L. M. BURUIANĂ şi V. PAVLU, Activitatea polarografică a proteinelor serice şi filtratelor sulfosalicilice, la diferite specii de animale 207
IANCU GONŢEA şi P. ŞUŢESCU, Cercetări asupra pierderii de azot prin transpiraţie 215
VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ, Obţinerea sucului plasmatic din seminţe 235
MEDARD KEREKES, Studiul acţiunii protectoare a unor glucide asupra denaturării prin căldură a proteinelor serice 245
MEDARD KEREKES, Studiul electroforetic al proteinelor serice denaturate prin căldură 251
MIOARA CÎRSTEANU, Influenţa hiperemiei experimentale, timpului şi temperaturii asupra exosmozei electroliţilor din pielea umană normală 255
V. BRATU, P. TEITEL şi GR. TURCU, Determinarea radiocromatografică pe schimbători de ioni a siderofilinei şi importanţa ei pentru diagnostic . . . 263
G. HARALAMBIE, Eliminarea indicanului în efortul fizic. I. Alegerea unui procedeu de dozare adecvat 271

NOTE DE LABORATOR

D. ONEŞANU, O metodă cromatografică pentru dozarea epicortizolului 281
M. SAFTA, Determinarea acidului lactic în nutreţul de porumb însilozat, prin metoda cromatografiei pe hîrtie 285

RECENZII 289

CRONICA BIOCHIMIEI DIN R.P.R. 313

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome VI, nº 2 1963

SOMMAIRE

	Page
A. V. PALLADIN, Métabolisme protéique dans le cerveau pendant l'hibernation	173
E. MACOVSCHI et CORINA IORDACHE, Les coefficients isométriques et les relations entre l'effort et le phosphagène musculaire	181
S. OERIU et E. MÎRZA, Contribution à l'étude de la corrélation biochimique entre l'âge et l'athérosclérose	201
L. M. BURUIANĂ et V. PAVLU, Activité polarographique des protéines sériques et des filtrats sulfosalicyliques chez différentes espèces animales	207
IANCU GONȚEA et P. ȘUȚESCU, Recherches sur la déperdition d'azote par transpiration	215
VICTOR GHEȚIE et LUCIA BUZILĂ, Obtention du suc plasmatique des graines	235
MEDARD KEREKES, Action protectrice de certains glucides sur la dénaturation par la chaleur des protéines sériques	245
MEDARD KEREKES, Etude électrophorétique des protéines sériques dénaturées par la chaleur	251
MIOARA CÎRSTEANU, Influence de l'hyperhémie expérimentale, du temps et de la température sur l'exosmose des électrolytes de la peau humaine normale	255
V. BRATU, P. TEITEL et GR. TURCU, Détermination radiochromatographique sur échangeurs d'ions de la sidérophiline et son importance diagnostique	263
G. HARALAMBIE, L'élimination de l'indicane pendant l'effort physique. I. Choix d'un procédé de dosage adéquat	271
NOTES DE LABORATOIRE	
D. ONEȘANU, Méthode chromatographique pour le dosage de l'épicortisolé	281
M. SAFTA, Détermination chromatographique sur papier de l'acide lactique dans le maïs ensilé	285
COMPTES RENDUS	289
CHRONIQUE DE LA BIOCHIMIE DANS LA R.P.R.	313

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том VI, № 2 1963

СОДЕРЖАНЕ

Стр.

А. В. ПАЛЛАДИН, Обмен белков в головном мозгу при зимней спячке 173
Е. МАКОВСКИЙ И КОРИНА ИОРДАКЕ, Изометрические коэффициенты и соотношение между напряжением и мышечным фосфагеном 181
С. ОЕРИУ и Е. МЫРЗА, К вопросу об изучении биохимического соотношения между возрастом и атеросклерозом 201
Л. М. БУРУЯНЭ и В. ПАВЛУ, Полярографическая активность сывороточных белков и сульфосалициловых фильтратов у различных видов животных. 207
ИАНКУ ГОНЦЯ и П. СУЦЕСКУ, Исследования потерь азота путем выпота 215
ВИКТОР ГЕЦИЕ и ЛУЧИЯ БУЗИЛЭ, Получение плазматического сока из семян 235
МЕДАРД КЕРЕКЕШ, Изучение защитного действия некоторых сахаров на денатурирование сывороточных белков под влиянием тепла . . 245
МЕДАРД КЕРЕКЕШ, Электрофоретическое исследование сывороточных белков, денатурированных под влиянием тепла 251
МИОАРА КЫРСТЯНУ, Влияние экспериментальной гиперемии, времени и температуры на эксосмоз электролитов из нормальной кожи человека 255
В. БРАТУ, П. ТАЙТЕЛ и ГР. ТУРКУ, Радиохроматографическое определение сидероферина на ионообменных веществах и его значение для диагноза 263
Г. ХАРАЛАМБИЕ, Выделение индикана при физической нагрузке. I. Выбор подходящего метода определения 271

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАМЕТКИ

Д. ОНЕШАНУ, Хроматографический метод для определения эпикортизола 281
М. САФТА, Определение молочной кислоты в силосованном кукурузном корме методом хроматографии на бумаге 285

РЕЦЕНЗИИ 289

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 313

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

METABOLISMUL PROTEIC ÎN CREIER ÎN CONDIȚIILE HIBERNĂRII*)

DE

ACADEMICIAN A. V. PALLADIN

Din punct de vedere biologic, hibernarea este o adaptare particulară a organismului animal la temperatura scăzută a mediului înconjurător, fixată în procesul de evoluție.

Hibernarea reprezintă o stare prelungită, rareori întreruptă, de repaos adînc a animalelor, care în perioada lor activă de viață sînt homeoterme. Starea de hibernare se caracterizează printr-o temperatură scăzută a corpului, o scădere extremă a funcțiilor fiziologice (respirația, circulația sîngelui, excreția), o scădere bruscă a intensității metabolismului substanțelor, o inhibiție adîncă a activității sistemului nervos central. Stingerea fiziologică a tuturor proceselor activității vitale ale organismului în timpul hibernării, creșterea lor rapidă în momentul trezirii, care se poate produce ușor în mod artificial, ridicînd temperatura mediului înconjurător, și trecerea treptată ulterioară la nivelul caracteristic stării de veghe, prezintă un interes deosebit pentru studierea proceselor biochimice din creier, întrucît pe cale experimentală nu se poate practic produce o inhibiție adîncă sau o excitație bruscă a activității sistemului nervos central, fără întrebuințarea unor acțiuni nefiziologice brutale asupra organismului, și nu se pot urmări variațiile compoziției chimice și ale intensității evoluției proceselor biochimice din creier în aceste stări funcționale.

În afară de aceasta, studiul proceselor metabolismului substanțelor, în care intră și metabolismul proteic din sistemul nervos central și din alte organe, în timpul hibernării, cînd temperatura corpului animalului este mult scăzută, este necesar pentru cunoașterea mecanismului hibernării și prezintă un interes teoretic și practic pentru medicina contemporană.

---

*) Comunicare ținută în ziua de 26 octombrie 1962 la Academia R.P.R. Traducerea a fost efectuată de Corina Iordache, cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

În literatură nu am găsit date care să caracterizeze intensitatea metabolismului proteic din creierul animalelor, care hibernează în condițiile activității funcționale diferite a sistemului lor nervos central. Există doar date obținute anterior în institutul nostru (Skvirskaia și Silici) [1] asupra includerii scăzute a fosforului radioactiv în fosfoproteinele țesutului cerebral în timpul hibernării și asupra creșterii bruște a acestui proces în timpul trezirii animalelor. Aceste date arată că metabolismul fosfoproteinelor din creier este scăzut în hibernare și că el crește brusc la trezirea artificială.

Se știe, de asemenea, că în stările hipotermice produse artificial animalelor are loc o scădere considerabilă a intensității metabolismului proteic în diferite țesuturi, între care intră și țesutul cerebral. Totuși, starea funcțională a animalelor în timpul hibernării naturale și hipotermia produsă artificial pot fi comparate doar aproximativ între ele, atît în ceea ce privește gradul de hipotermie, cît și în ceea ce privește caracterul apariției ei.

Ne-am propus să cercetăm intensitatea metabolismului proteic în creierul popîndăilor, în diferite stări funcționale ale organismului, în condiții de hibernare, care se caracterizează printr-o inhibiție adîncă a activității sistemului nervos central, în stare de veghe și, în trezirea artificială, care este însoțită de o bruscă creștere a activității creierului.

Intensitatea metabolismului s-a apreciat după viteza de includere a metioninei radioactive în proteinele cerebrale.

Animalele, aflate în stare de hibernare și trezite artificial au fost supuse cercetării în lunile ianuarie—martie, iar cele aflate în stare de veghe în luna iunie.

Metionina — S^{35} a fost introdusă subcutan cu 18 ore înainte de sacrificarea popîndăilor, calculîndu-se 10 000 imp/min/g greutate corporală (popîndăilor în hibernare — în starea de hibernare, celor în stare de veghe — în starea de viață activă, iar celor în stare de trezire artificială — imediat după trezirea lor produsă prin creșterea temperaturii mediului înconjurător).

După introducerea metioninei radioactive, popîndăii în hibernare au fost lăsați în stare de hibernare într-o încăpere cu temperatura scăzută, iar cei treziți artificial și cei în stare de veghe — la temperatura camerei, în stare de viață activă.

În prima parte a cercetărilor făcute la Institutul de biochimie al Academiei de științe a R.S.S. Ucraina, de către cercetătorii științifici Ia. V. Belik și L. S. Kraciko [2], s-a cercetat intensitatea de includere a metioninei marcate în proteinele cerebrale totale.

Creierul, după îndepărtarea membranelor vasculare, vaselor și sîngelui, s-a mojarat, proteinele s-au precipitat cu acid tricloracetic și după aceea s-au solvit într-o soluție 0,2 N de hidroxid de sodiu și s-au precipitat din nou cu acid tricloracetic. Reprecipitarea s-a făcut de două ori, după care proteinele s-au spălat cu acid tricloracetic 5 % și s-au extras acizii nucleinici cu acid tricloracetic 5 %, pe baia de apă la 90°, timp de 15 minute. Precipitatul proteic s-a spălat cu acid tricloracetic 5 %, la temperatura camerei, și s-a extras succesiv cu acetonă, alcool, eter la temperatura camerei, și de două ori cu amestec de metanol-cloroform 1 : 1, pe baia de apă, timp de o oră, după care s-a spălat cu eter. Această prelucrare a permis să se obțină proteina practic eliberată de lipide, de acizi nucleinici, de metionină radioactivă liberă și de alte substanțe cu moleculă mică. Proteina uscată pînă la greutate constantă s-a folosit pentru determinarea radioactivității (s-au preparat 2—3 exemplare care conțineau cîte 10 mg proteină).

Determinările radioactivității specifice a proteinelor cerebrale în condițiile hibernării, stării de veghe și în trezire artificială au arătat că, în timpul hibernării, care poate fi privită ca un proces de inhibiție îndelungată și adîncă a activității cerebrale, reînnoirea proteinelor cerebrale se găsește la un nivel extrem de scăzut, iar în unele experiențe, cînd animalele s-au găsit în stare de amorțire profundă, a fost practic egală cu zero (fig. 1).

În trezirea artificială a popîndăilor, care este însoțită de o creștere bruscă a activității nervoase, intensitatea de reînnoire a proteinelor cerebrale a fost în medie de 25 de ori mai crescută decît la popîndăii în hibernare.

În ceea ce privește reînnoirea proteinelor cerebrale la popîndăii în stare de veghe, care ocupă o poziție intermediară, radioactivitatea specifică a proteinelor cerebrale este de cîteva ori mai crescută decît la cei în hibernare, dar cu mult mai scăzută decît la cei treziți artificial.

Intensitatea de includere a radiometioninei în proteinele serului sanguin la popîndăii treziți artificial a fost de asemenea cu mult mai crescută decît la cei în hibernare.

Pentru a verifica dacă diferențele arătate în viteza de includere a radiometioninei în proteinele cerebrale sînt condiționate de diferențe în permeabilitatea barierei „sînge-creier" în diverse stări funcționale, am determinat radioactivitatea specifică a fracțiunii acidosolubile a țesutului cerebral în timpul hibernării, stării de veghe și trezirii artificiale. Această fracțiune poate fi privită drept un „complex metabolic" particular, de unde celulele obțin materialul necesar pentru sinteza și reînnoirea părților lor componente.

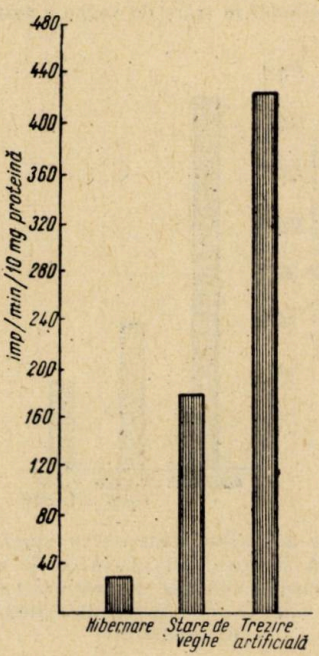


Fig. 1. — Radioactivitatea proteinelor țesutului cerebral al popîndăilor în diferite stări funcționale (imp/min/10 mg proteină).

Aceste determinări, ale căror rezultate sînt date în figura 2, au arătat că radioactivitatea cea mai ridicată a fracțiunii acidosolubile din creier se constată la popîndăii în hibernare; ea a fost mult mai scăzută la cei în stare de veghe și la cei treziți artificial.

Prin urmare, se poate considera că diferențele arătate mai înainte în intensitatea metabolismului proteinelor cerebrale la popîndăii în hibernare, pe de o parte, și la cei în stare de veghe și treziți artificial, pe de altă parte, sînt condiționate de intensitatea diferită a proceselor de sinteză și de reînnoire a proteinelor cerebrale în aceste stări și nu de variațiile permeabilității barierei „sînge-creier".

În a doua parte a cercetărilor, pentru a studia intensitatea metabolismului proteic în diferite structuri subcelulare separate ale țesutului cere-

bral la popîndăi, Ia. V. Belik a cercetat intensitatea procesului de includere a metioninei marcate cu sulf radioactiv în proteinele nucleilor, mitocondriilor uşoare şi grele, în microzomi şi în fracţiunea citoplasmatică solubilă, în hibernare, în stare de veghe şi după trezirea artificială.

Spre deosebire de seria anterioară de experienţe, în această parte a cercetărilor grupa de popîndăi în stare de veghe a fost supusă cercetărilor în lunile septembrie-octombrie, şi nu în luna iunie, adică nu după ieşirea din starea de hibernare, ci înainte de apariţia ei.

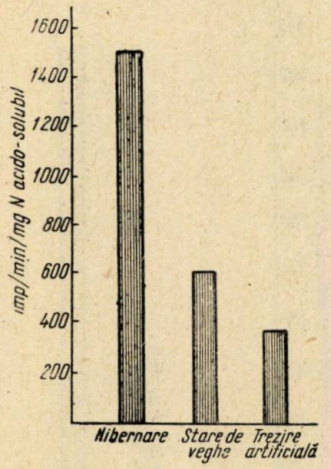


Fig. 2. — Radioactivitatea specifică a fracţiunii acidosolubile a ţesutului cerebral al popîndăilor în diferite stări funcţionale (imp/min/mg azot).

Pentru obţinerea unei cantităţi suficiente de proteine din structurile subcelulare, în fiecare experienţă s-a luat creierul de la trei animale. Metionina radioactivă s-a introdus cu 18 ore înainte de sacrificarea animalelor. Ţesutul cerebral s-a omogenizat la rece, într-un omogenizator manual de sticlă, cu 9 volume de soluţie 0,25 M de zaharoză care conţinea 0,00036 M clorură de calciu.

Fracţiunile celulare au fost obţinute prin metoda centrifugării diferenţiale a omogenatului cerebral la temperatura de 1—2°C, la centrifuga de viteze mari, cu răcire [3].

Fracţiunea citoplamatică solubilă, după toate probabilităţile conţinea cele mai mici structuri subcelulare întrucît forţa centrifugă maximă folosită de noi pentru precipitarea microzomilor era 75 000 g.

Din aceste fracţiuni celulare s-au extras şi s-au prelucrat, după metoda amintită, proteinele şi s-a determinat radioactivitatea lor. Rezultatele sînt reprezentate în figura 3.

După cum se vede din figură, radioactivitatea proteinelor tuturor fracţiunilor intracelulare cercetate din creierul popîndăilor a fost mult mai scăzută la popîndăii în hibernare; la cei treziţi artificial, ea a fost de două ori mai crescută decît la cei în hibernare, iar la cei în stare de veghe, de cîteva zeci de ori mai crescută decît la cei în hibernare, dar cu 15—30% mai scăzută decît la cei treziţi artificial.

În limitele fiecărei grupe de animale cercetate (în hibernare, în stare de veghe şi trezite artificial), intensitatea includerii radiometioninei în proteinele diferitelor fracţiuni celulare nu a fost aceeaşi. Includerea cea mai activă a radiometioninei a avut loc în proteinele microzomilor, ca şi în fracţiunea citoplasmatică solubilă.

Radioactivitatea specifică a proteinelor nucleilor a fost întrucîtva mai scăzută, mult mai scăzută a fost radioactivitatea specifică a proteinelor mitocondriilor uşoare şi în special a mitocondriilor grele.

Datele obţinute de noi, arată deci pe de o parte diferenţe apreciabile în intensitatea metabolismului proteic în creierul popîndăilor în timpul hibernării, stării de veghe şi trezirii artificiale. Aceste diferenţe se observă nu numai la studierea vitezei de includere şi a sintezei proteinelor totale ale creierului, dar şi la cercetarea metabolismului proteic al diferitelor structuri intracelulare.

Pe de altă parte, aceste date arată că proteinele diverselor structuri celulare, luate separat, includ aminoacizii marcați cu o intensitate diferită. În toate stările funcționale studiate la popîndăi, cea mai mare activitate metabolică au prezentat-o proteinele microzomilor, mult mai puțin intens se metabolizează proteinele nucleilor și încă mai încet proteinele mitocondriilor.

Un interes deosebit prezintă radioactivitatea mai crescută a proteinelor totale cerebrale și a proteinelor din fracțiunile celulare separate la popîndăii treziți artificial, cînd sistemul nervos ajunge în starea de excitație puternică, în comparație cu aceeași stare la animalele în stare de veghe ; pe alte specii de animale, problema intensității proceselor de reînnoire a proteinelor în starea de excitație și de inhibiție a activității sistemului nervos central este greu de rezolvat : diverși cercetători, studiind metabolismul proteic în inhibiția activității cerebrale produsă cu ajutorul substanțelor narcotice, precum și în starea de excitație produsă prin acțiunea substanțelor farmacologice sau a altor factori, ca excitația electrică, au obținut rezultate contradictorii.

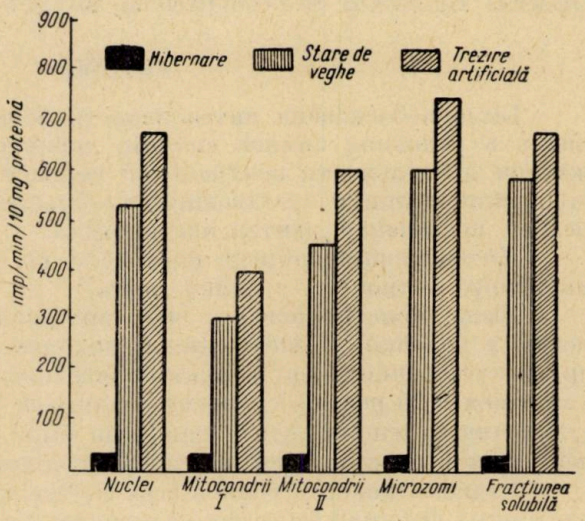


Fig. 3. — Radioactivitatea proteinelor fracțiunilor celulare ale țesutului cerebral al popîndăilor în diferite stări funcționale (imp/min/10 mg proteină).

Cercetările anterioare întreprinse de Skvirskaia [4] în Institutul nostru, pe baza intensității de includere a fosforului marcat, au arătat că metabolismul acizilor nucleinici în creierul popîndăilor este de asemenea scăzut în timpul hibernării și crește de cîteva zeci de ori în starea de veghe.

Exact la fel, după datele lui Haikina [5], în timpul hibernării scade metabolismul glicogenului în creier, în comparație cu cel al animalelor în stare de veghe normală, judecînd după intensitatea de includere a carbonului radioactiv în glicogenul cerebral.

Prin urmare, la animalele în stare de hibernare, în diferite stări funcționale se schimbă nu numai metabolismul substanțelor proteice în creier, ci și metabolismul unei serii întregii de substanțe.

Trebuie să credem că scăderea bruscă a intensității metabolismului proteic, ca și a altor substanțe în creier, în timpul hibernării, la fel ca și scăderea puternică a altor procese biochimice, joacă un rol biologic impor-

tant, contribuind la o cheltuire economică a substanţelor necesare vieţii în decursul şederii îndelungate a organismului în condiţiile neprielnice ale mediului înconjurător.

Prezentată la redacţie la 10 noiembrie 1962

Institutul de biochimie
al Academiei de ştiinţe a R.S.S. Ucraina,
Kiev

ОБМЕН БЕЛКОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

РЕЗЮМЕ

Была исследована интенсивность белкового обмена в мозгу сусликов в условиях зимней спячки, характеризуемой глубоким торможением деятельности центральной нервной системы в состоянии бодрствования и при искусственном пробуждении, которому сопутствует резкое повышение деятельности мозга.

Интенсивность обмена оценивали по скорости включения радиоактивного метионина в белки мозга.

Было констатировано, что интенсивность обновления белков мозга, в условиях зимней спячки, находится на очень низком уровне; при искусственном пробуждении интенсивность обновления возрастала в среднем в 25 раз, по сравнению с зимней спячкой; в состоянии бодрствования интенсивность обновления была больше, чем во время зимней спячки, но ниже чем при искусственном пробуждении.

Радиоактивность белков всех экстрагированных из мозга внутриклеточных фракций была также понижена у животных, находящихся в состоянии спячки и повышена в случае искусственного пробуждения; радиоактивность внутриклеточных белков в состоянии бодрствования занимает промежуточное место.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Радиоактивность белков мозговой ткани сусликов в различных функциональных состояниях (имп/мин/10 мг белка).

Рис. 2. — Специфическая радиоактивность кислоторастворимой фракции мозговой ткани сусликов в различных функциональных состояниях (имп/мин/мг азота).

Рис. 3. — Радиоактивность белков клеточных фракций мозговой ткани сусликов в различных функциональных состояниях (имп/мин/10 мг белка).

MÉTABOLISME PROTÉIQUE DANS LE CERVEAU PENDANT L'HIBERNATION

RÉSUMÉ

On a étudié l'intensité du métabolisme des protéines dans le cerveau chez les spermophiles en état d'hibernation, état caractérisé par une profonde inhibition de l'activité du système nerveux central, en état de veille et

après le réveil artificiel, le dernier étant accompagné d'une brusque augmentation de l'activité cérébrale.

L'intensité du métabolisme a été appréciée par la vitesse de pénétration de la méthionine radioactive dans les protéines du cerveau.

On a pu constater que dans l'état d'hibernation l'intensité du renouvellement des protéines cérébrales se trouvait à un très bas niveau ; par contre , après un réveil provoqué, cette intensité était en moyenne 25 fois plus grande et enfin à l'état de veille elle avait des valeurs intermédiaires.

De même la radioactivité des protéines de toutes les fractions intracellulaires extraites du cerveau a occupé pour l'état de veille une place intermédiaire entre les basses valeurs des animaux en état d'hibernation et les valeurs accrues constatées après le réveil provoqué.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Radioactivité des protéines du tissu cérébral chez les spermophiles dans divers états fonctionnels (imp/min/10 mg protéine).

Fig. 2. — Radioactivité spécifique de la fraction acidosoluble du tissu cérébral chez les spermophiles dans divers états fonctionnels (imp/min/mg azote).

Fig. 3. — Radioactivité des protéines des fractions cellulaires du tissu cérébral des spermophiles dans divers états fonctionnels (imp/min/10 mg protéine).

BIBLIOGRAFIE

1. СКВИРСКАЯ Э. Б. и СИЛИЧ Т. П., *Сборник „Биохимия нервной системы"*, Киев, 1954, стр. 36.
2. БЕЛИК Я. В. и КРАЧКО Л. С., Укр. Биохим. Журн., *31*, 322 (1959).
3. ПАЛЛАДИН А. В., БЕЛИК, Я. В. и КРАЧКО Л. С., ДАН СССР, 127, 702 (1959).
4. СКВИРСКАЯ Э. Б. и СИЛИЧ Т. П., Сборник „Труды Всесоюзн. Конференции по применению изотопов в науке", Москва, 1958, стр. 10.
5. ХАЙКИНА Б. И., *Сборник „Углеводы и углеводный обмен в животном и растительном организмах"*, Ленинград, 1959, стр. 130.

COEFICIENȚII IZOMETRICI ȘI RELAȚIILE DINTRE EFORT ȘI FOSFAGENUL MUSCULAR

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI și CORINA IORDACHE

Pentru măsurarea travaliului fiziologic al unui mușchi izolat se recurge adesea la metoda contracției izometrice. După O. Meyerhof [1] această metodă prezintă avantajul că „în calculul travaliului fiziologic nu intervine decît o singură mărime, aceea a tensiunii dezvoltate". Admițînd că tensiunea dezvoltată de mușchi este proporțională cu metabolismul său pe unitatea de lungime, O. Meyerhof [2] și J. Parnas [3] au propus pentru exprimarea relațiilor dintre tensiunea dezvoltată în contracție izometrică și unele reacții biochimice din mușchi, coeficienții K_m și K_z, primul denumit coeficient izometric pentru secuse izolate, iar celălalt coeficient izometric pentru tetanos :

$$K_m = \frac{S \cdot L}{M} \qquad K_z = \frac{S \cdot L \cdot T}{M}$$

În formulele acestor coeficienți , S reprezintă tensiunea (*Spannung* — efort) dezvoltată de mușchi în urma excitației primite și exprimată în kilograme; L — lungimea mușchiului exprimată în centimetri; T — durata tetanosului exprimată în secunde; M — cantitatea substanței exprimată în miligrame, care se descompune sau se formează în mușchi în urma travaliului efectuat.

Inițial, O. Meyerhof și J. Parnas au folosit coeficienții K_m și K_z pentru interpretarea relațiilor dintre tensiunea dezvoltată de mușchi și cantitatea de acid lactic, respectiv de ioni de amoniu, formată în cursul contracției izometrice. S-a constatat că pentru mușchii cu fibre paralele valorile coeficientului izometric K_m sînt independente de natura mușchiului și aproape independente de temperatură, variind puțin în funcție de tensiunea inițială și mult în funcție de gradul de oboseală.

Ulterior, D. Nachmansohn [4] [5] [6] lucrînd pe mușchi de broască izolat și excitat în condițiile de izometrie, a aplicat coeficienții K_m și K_z la

fosfagen și a constatat că valorile K_m și K_z „cresc pe măsură ce se mărește numărul excitațiilor succesive, respectiv durata tetanosului; cu alte cuvinte, cantitatea fosfagenului descompus în raport cu travaliul efectuat devine mai mică, pe cînd formarea acidului lactic merge paralel cu tensiunea" [6 *a*]. De aici concluzia că deși „descompunerea fosfagenului nu este legată direct de mărimea tensiunii (*Spannungsleistung*)" (6 *a*), totuși „înainte de toate și independent de orice teorie, se recunoaște existența anumitor relații legice dintre gradul de descompunere a fosfagenului și tensiune : descompunerea stă, fără îndoială, în legătură cu această tensiune, fără ca între ele să existe o proporționalitate" [6 *b*]. Considerînd astfel că într-o anumită măsură coeficienții izometrici pot servi la exprimarea relațiilor dintre tensiunea dezvoltată, adică efortul depus de mușchi și descompunerea fosfagenului muscular, autorul menționat a recurs la acești coeficienți pentru interpretarea rezultatelor cercetărilor sale experimentale atît cu privire la legătura dintre biochimismul fosfagenului și efortul muscular, cît și la corelația dintre excitabilitatea unui mușchi și descompunerea fosfagenului în cadrul unui efort dat.

Era de prevăzut ca legăturile dintre biochimismul fosfagenului, efortul muscular și excitabilitatea descoperite de D. Nachmansohn pe mușchi izolat și excitat în condiții de izometrie să aibă un caracter general și să fie valabile în alte condiții de experimentare, ca de exemplu în cazul unui mușchi *in situ* excitat în condiții de izotonie. Or, cercetările noastre [7] nu au confirmat această prevedere.

În adevăr, din moment ce, după D. Nachmansohn, relațiile dintre descompunerea fosfagenului și efortul efectuat de mușchi pot fi exprimate de coeficienți izometrici, chiar dacă între aceste mărimi nu există proporționalitate, era de așteptat că, în condițiile de izotonie și fără încărcare, cînd efortul S depus de mușchi este practic nul (a se vedea formulele celor doi coeficienți), și M să fie egal cu zero, adică descompunerea fosfagenului să nu aibe loc. Or, determinările noastre au demonstrat că și în aceste condiții excitarea mușchilor este urmată de o scădere apreciabilă a nivelului fosfagenului muscular, deși mușchii nu depun efort [7 *a*].

La fel și în cazul legăturii dintre excitabilitate și descompunerea fosfagenului în cadrul unui efort dat. După D. Nachmansohn, în cadrul aceluiași efort efectuat de mușchi curarizați a căror excitabilitate este scăzută, gradul de descompunere a fosfagenului este mai mic decît în mușchii normali [4 *a*]. Or, lucrînd în condiții de izotonie și fără încărcare, am constatat că excitația electrică directă duce la aceeași descompunere a fosfagenului în mușchii curarizați ca și în cei normali [7 *b*], așa că, cel puțin în condițiile în care am lucrat noi, descompunerea fosfagenului s-a dovedit a fi independentă de gradul de excitabilitate a mușchiului.

Pentru explicarea acestor nepotriviri, s-ar putea evoca faptul că, cercetările fiind efectuate în condiții diferite, rezultatele respective sînt valabile numai în condițiile în care au fost obținute. Aceasta însă ar însemna ca concluziile obținute pe baza cercetărilor efectuate pe mușchi izolat și excitat în condiții de izometrie să fie valabile numai în acest caz și să nu poată fi generalizate asupra mușchiului *in situ*, excitat în condiți, de izotonie. Totuși, ar fi greu de admis ca relațiile dintre efortul muscular,

descompunerea fosfagenului și excitabilitate să varieze de la caz la caz în funcție de condițiile experimentale și să nu aibe o valabilitate generală. De aceea, această explicație ni s-a părut puțin verosimilă.

O altă explicație a nepotrivirilor menționate ar putea fi căutată în faptul că interpretarea datelor experimentale s-a făcute de pe baze diferite. Într-adevăr, D. Nachmansohn a recurs la valorile coeficienților izometrici, pe cînd noi la cantitățile de fosfagen descompus. Nu ar fi însă exclus ca interpretarea rezultatelor experimentale pe baza coeficienților menționați să ducă la alte concluzii decît interpretarea pe baza cantităților de fosfagen descompus, dat fiind că, în calculul acestor coeficienți, pe lîngă fosfagen descompus, mai intervin : efortul efectuat de mușchi și durata excitației, a căror valori variază în limite largi după modul de experimentare, repercutîndu-se puternic asupra valorilor coeficienților, precum și lungimea mușchiului care, deși variază în limite restrînse, din cauză că cercetările se efectuează în general pe animale cam de aceeași mărime, totuși poate și ea să influențeze mărimea coeficienților. De aceea, pentru compararea concluziilor care s-au desprins atît din lucrările autorului menționat, cît și din lucrările noastre, se impunea ca, în ambele cazuri, rezultatele experimentale să fie intepretate în același fel, adică fie pe baza coeficienților izometrici, fie pe baza valorilor de fosfagen descompus.

Aplicarea coeficienților izometrici în scopul arătat ar necesita în primul rînd exprimarea și interpretarea rezultatelor noastre experimentale prin acești coeficienți, iar apoi compararea concluziilor respective cu concluziile la care a ajuns D. Nachmansohn, interpretînd pe aceeași bază rezultatele cercetărilor sale. Însă , o astfel de comparație se exclude, deoarece rezultatele cercetărilor noastre, efectuate în condițiile de izotonie și fără încărcare, adică fără efectuarea efortului, nu pot fi exprimate prin coeficienți izometrici.

Procedura se inversează dacă se recurge la cantitățile de fosfagen descompus. Aici, în primul rînd e necesară reinterpretarea rezultatelor experimentale obținute de D. Nachmansohn, folosindu-se fosfagenul descompus în locul coeficienților izometrici, iar apoi compararea concluziilor respective cu concluziile la care am ajuns noi, interpretînd tot pe aceeași bază rezultatele cercetărilor noastre. O astfel de comparație s-a dovedit posibilă, datorită faptului că materialul documentar publicat de acest autor, pe lîngă valorile coeficienților izometrici, cuprinde și cantitățile de fosfagen descompus.

Urmează deci să interpretăm, pe bază de fosfagen, rezultatele experimentale obținute de D. Nachmansohn și să le comparăm cu concluziile lucrărilor noastre. Cum însă aceleași rezultate au fost interpretate de autorul lor pe bază de coeficienți izometrici, vom prezenta cele două interpretări alături una de alta, pentru a scoate în evidență deosebirea dintre ele.

Întîi vom lua în considerație problema raporturilor dintre descompunerea fosfagenului și efortul efectuat de mușchi.

După cum rezultă din datele publicate de D. Nachmansohn, în cazul mușchiului gastrocnemian normal, izolat și tetanizat succesiv de mai multe ori timp de cîte 2 sec (tabela nr. 1), aceeași descompunere de fosfagen poate însoți efectuarea unor eforturi diferite. Astfel, se descom-

pune cam 0,50—0,75 mg H_3PO_4 — fosfagen, fie că muşchiul tetanizat o singură dată efectuează efort de 2,7—4,2 kg × sec, fie că, tetanizat, de-de cinci ori, efectuează efortul de 13,5 kg × sec. Se ajunge deci la concluzia că într-un muşchi normal efortul efectuat nu depinde de cantitatea de fosfagen descompus.

Tabela nr. 1

Coeficientul izometric K_z al descompunerii fosfagenului în muşchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat şi supus, în condiţii de izometrie, excitaţiilor tetanice directe şi succesive de cîte 2 sec., la 30 sec interval între tetanizări. [Datele sînt extrase din tabela I publicată de D.N. în Biochem. Z., 208, 239—240 (1929) şi astfel alese încît reprezintă rezultatele experimentale obţinute pe muşchi cam de aceeaşi lungime: 2,6—3,0 cm şi în care fosfagenul s-a descompus cam în aceleaşi limite: 0,50—0,75 mg H_3PO_4 — fosfagen]

Nr. crt.	Nr. tetanizări	*L* Lungimea muşchiului (cm)	*S.T.* Efort *S* (kg) Timp *T* (sec)	*M* Fosfagen descompus mg H_3PO_4	K_z	Nr. experienţei din tabela I
1	2	3	4	5	6	7
1	1	2,8	2,7	0,54	14	3
2	1	3,0	3,4	0,73	14	2
3	1	2,9	4,2	0,58	21	1
4	2	2,7	4,0	0,61	18	6
5	2	2,6	4,0	0,58	18	7
6	2	2,6	6,0	0,51	30	8
7	3	2,6	7,5	0,70	28	10
8	4	2,7	10,6	0,69	41	14
9	5	2,6	13,5	0,69	51	15

Dacă însă, în locul cantităţii fosfagenului descompus se examinează valorile coeficientului izometric K_z, se constată că aceste valori nu sînt constante şi cresc progresiv de la 14 la 51. Faptul acesta a fost interpretat în modul următor: formula coeficientului K_z arată că, în cazul efectuării unui anumit efort ($S.T.$ = const.) de un muşchi de aceeaşi lungime (L = = const.) valoarea coeficientului K_z devine cu atît mai mare cu cît cantitatea fosfagenului descompus (M) este mai mică. În aceste condiţii, unei creşteri a coeficientului K_z de la 14 la 51, adică de 3,65 ori, îi corespunde o scădere în aceeaşi proporţie a descompunerii fosfagenului muscular. Aceasta înseamnă că efectuarea unui anumit efort în cadrul celor cinci tetanizări, cînd K_z = 51, este însoţită de o descompunere de fosfagen de 3,65 ori mai mică decît în cadrul unui singur tetanos, cînd K_z = 14. Concret: dacă efortul efectuat este de 2,7 kg × sec, atunci se descompun 0,54 mg H_3PO_4 — fosfagen (experienţa 1), iar dacă efortul este de 13,5 kg × sec şi în cadrul lui se descompun 0,69 mg H_3PO_4 — fosfagen (experienţa 9), atunci efectuarea aceluiaşi efort de 2,7 kg × sec este însoţită de descompunerea a numai 0,69 : 3,65 = 0,19 mgH_3PO_4 — fosfagen (pentru simplificarea calculului, s-a admis că muşchii au avut aceeaşi lungime). De aici, afirmaţia făcută de D. Nachmansohn că o creştere a valorii coeficientului izometric indică o „restrîngere a descompunerii fosfagenului" muscular. Astfel, interpretarea datelor din tabela nr. 1, pe baza coeficien-

tului izometric K_z, duce la concluzia că într-un mușchi normal descompunerea fosfagenului, care însoțește un anumit efort, este cu atît mai mică, mai restrînsă, cu cît mai mare este efortul respectiv.

Situație asemănătoare se constată și în cazul mușchiului curarizat.

Datele obținute pe mușchi gastrocnemian, curarizat, izolat și supus excitațiilor directe succesive (tabela nr. 2) arată că, pînă la un efort de aproximativ 50 kg (experiențele 1—4), se descompune relativ puțin fosfagen. Începînd însă de la efortul de 50 kg în sus (experiențele 5—10), cantitatea fosfagenului descompus rămîne aproape aceeași, variind în limitele înguste (1,9—2,2), în jurul valorii de 2,0 mg H_3PO_4-fosfagen, deși efortul efectuat de mușchi variază între 50 și 134 kg. De aici concluzia că descompunerea fosfagenului nu depinde de efortul efectuat, dacă acesta depășește 50 kg.

Tabela nr. 2

Coeficientul izometric K_m al descompunerii fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) curarizat, izolat și supus în condiții de izometrie excitațiilor directe succesive. [Datele sînt extrase din tabela IV publicată de D.N. în Biochem. Z., 196, 80 (1928)]

Nr. crt.	Numărul excitațiilor	L Lungimea mușchiului (cm)	S Efort S (kg)	M fosfagen descompus (mgH_3PO_4)	K_m	Nr. experienței din tabela IV
1	2	3	4	5	6	7
1	30	3,1	11	0,32	107	1
2	30	3,2	12	0,355	107	2
3	63	3,2	27	0,88	100	3
4	100	2,9	39	0,90	125	4
5	120	3,0	66	1,97	101	5
6	171	3,0	70,5	1,88	112	6
7	197	3,2	85	2,22	122	7
8	275	3,2	127	2,02	200	9
9	285	3,2	134	1,85	230	10
10	300	3,1	106	2,15	153	8

Să examinăm acum aceleași date de pe pozițiile coeficientului izometric K_m. Se constată că, pînă la efortul de 100 kg (experiențele 1—7), valorile acestui coeficient oscilează între 100 și 125, fiind în medie 111. Înseamnă că în acest domeniu există o oarecare proporționalitate între fosfagenul descompus și efortul efectuat. Este însă deajuns ca efortul să depășească 100 kg, pentru ca coeficientul K_m să prezinte o creștere însemnată, atingînd valoarea 230 în cazul efortului de 134 kg (experiențele 8—10). Acestei dublări a valorii coeficientului K_m îi corespunde, după D. Nachmansohn, o restrîngere la jumătate a descompunerii fosfagenului muscular. Astfel: în cazul efortului de 134 kg, efectuat de un mușchi de 3,2 cm lungime, $K_m = 230$ (experiența 9); înseamnă că, în aceste condiții, un efort de numai 70,5 kg ar fi însoțit de descompunerea a $M = 70,5 \times 3,0 : 230 = 0,92$ mg H_3PO_4 — fosfagen; or, în condițiile efectuării efective a efortului de 70,5 kg, căruia îi corespunde $K_m = 112$,

într-un mușchi de 3,0 cm lungime se descompun 1,88 mg H_3PO_4 — fosfagen (experiența 6). Prin urmare, ajungem la concluzia că, pînă la efortul de 100 kg, în mușchiul curarizat fosfagenul se descompune proporțional cu efortul efectuat, iar în cazul efectuării eforturilor mai intense se produce o „restrîngere" a descompunerii fosfagenului, la fel ca în mușchiul normal tetanizat.

Exemplele de mai sus arată că interpretarea aceloraşi rezultate experimentale, pe bază de fosfagen descompus şi pe bază de coeficienți, duce la concluzii diferite.

În primul caz se ajunge la concluzia că descompunerea fosfagenului şi efectuarea efortului muscular sînt două fenomene independente. Este de remarcat că această concluzie, desprinsă de noi prin interpretarea pe bază de fosfagen descompus a datelor experimentale obținute de D. Nachmansohn pe mușchi izolat şi excitat în condiții de izometrie, coincide cu concluzia despre independența dintre efort şi fosfagen muscular la care am ajuns prin interpretarea rezultatelor cercetărilor noastre efectuate pe mușchi *in situ* şi excitat în condiții de izotonie şi fără încărcare. Rezultă că *cercetările lui D. Nachmansohn şi cercetările noastre, deşi efectuate în condiții diferite, concordă între ele şi duc la aceeaşi concluzie, dacă interpretarea rezultatelor experimentale se face pe bază de fosfagen descompus.*

În cazul al doilea — din contră — interpretarea pe bază de coeficienți izometrici duce la concluzia că între efort şi fosfagen există o legătură legică, creşterea efortului fiind însoțită de restrîngerea descompunerii fosfagenului.

Rămîne de stabilit care dintre cele două concluzii este cea justă.

În acest scop luăm în considerație faptul că, după modul cum au fost definiți de O. Meyerhof şi J. Parnas, coeficienții izometrici K_m şi K_z sînt valabili numai în cazul cînd între tensiunea dezvoltată de mușchi şi unul dintre aspectele biochimismului muscular există o interdependență concretă : cantitatea substanței care se formează sau se descompune în mușchi în urma tensiunii dezvoltate depinde funcțional de această tensiune.Or, în cazul fosfagenului, dovezi experimentale pentru existența unei astfel de legături funcționale cu tensiune încă nu au fost aduse. Un oarecare paralelism şi totodată lipsa proporționalității în variația celor două mărimi, constatate de D. Nachmansohn la mușchii supuşi diferitelor excitații, nu constituie o dovadă în acest sens. Mai mult, chiar el a recunoscut că „spre deosebire de acid lactic, descompunerea fosfagenului nu stă în legătură directă cu mărimea tensiunii" (6 *a*) şi că variația mărimii coeficienților izometrici „ar putea duce la bănuiala că descompunerea fosfagenului stă mai puțin direct în legătură cu mărimea travaliului, şi mai mult cu natura procesului de excitație" [6 *c*]. Dar nu numai atît. Faptul că, în condițiile de izotonie şi fără încărcare, deci fără efectuare de efort atît la mușchiul *in situ* cît şi la cel izolat excitațiile sînt urmate de descompunerea fosfagenului, dovedesc lipsa unei legături funcționale directe dintre fosfagen şi efortul muscular [7] şi arată că, în cercetări cu efectuare de efort, scăderea fosfagenului nu se datoreşte efortului efectuat de mușchi, ci este provocată de excitație. Prin urmare, excitațiile ca atare sînt acelea

care acționează asupra nivelului fosfagenului din mușchi și fac ca acest nivel să scadă cu numărul și puterea excitațiilor, respectiv cu durata și numărul tetanizărilor, indiferent dacă cu această ocazie mușchiul execută efortul sau nu. Această concluzie este întărită de constatarea că, în cazurile cînd mușchiul este scos de sub influența impulsurilor nervoase naturale, ca de exemplu în narcoză, denervare, curarizare etc., nivelul fosfagenului muscular crește, depășind pe cel normal [8]. Tot în sprijinul acestei concluzii vin cercetările mai multor autori care au semnalat scăderea fosfagenului în cazul contracțiilor musculare provocate prin excitanți de natură diferită. Astfel, după G. Lange [9], fosfagenul scade în mușchiul excitat prin acetilcolină, clorură de potasiu, curent electric și alți agenți, iar după A. Yuichi [10] contracția izometrică este însoțită de scăderea apreciabilă a fosfagenului muscular.

Cele de mai sus ne fac să admitem că și în cazul cercetărilor efectuate de D. Nachmansohn pe mușchi izolat și excitat în condițiile de izometrie, scăderea fosfagenului se datorește de asemenea excitațiilor electrice aplicate mușchiului și nu efortului efectuat de mușchi.

De altfel, în sprijinul acestei păreri, în afara argumentelor menționate, se mai pot aduce și unele rezultate experimentale publicate de același autor. Într-adevăr, este de ajuns de comparat modul cum cantitatea fosfagenului descompus și efortul efectuat variază în funcție de numărul excitațiilor, respectiv tetanizărilor aplicate mușchiului. Datele obținute pe mușchi excitați succesiv (tabela nr. 3) și tetanizați (tabela nr. 4) și mai

Tabela nr. 3

Coeficientul izometric K_m al descompunerii fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat și supus în condiții de izometrie excitațiilor directe succesive. [Datele sînt extrase din tabela III publicată de D.N. în Biochem. Z., 196, 79 (1928)]

Nr. crt.	Numărul excitațiilor	L Lungimea mușchiului (cm)	S Efort S (kg)	M Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_m	Nr. experienței din tabela III
1	2	3	4	5	6	7
1	42	3,3	21	0,74	89	1
2	85	3,05	43	1,08	121	3 a
3	88	3,0	47	1,12	125	2
4	325	3,05	166	1,37	375	3 b

ales graficele respective (fig. 1 și 2) arată limpede că, la început, cantitatea fosfagenului descompus și efortul efectuat de mușchi cresc mai mult sau mai puțin paralel, pentru ca în curînd descompunerea fosfagenului să se oprească la un anumit nivel, rămînînd apoi practic constantă, pe cînd efortul continuă să crească, devenind din ce în ce mai însemnat. Astfel, primind 325 de excitații, mușchiul gastrocnemian efectuează un efort de patru ori mai mare decît la 85 de excitații (166 în loc de 43 kg), deși se descompun aproape aceleași cantități de fosfagen (1,37 respectiv 1,08 mg

H_3PO_4 — fosfagen) (tabela nr. 3). La fel și în caz de tetanizare : creșterea efortului de la 12,7 la 75,7 kg × sec — adică de șase ori — este însoțită de creșterea descompunerii fosfagenului de la 0,91 la numai 1,22 mg H_3PO_4 — fosfagen (tabela nr. 4). Or, faptul că mușchiul poate efectua eforturi diferite însoțite de aproape aceeași descompunere de fosfagen

Tabela nr. 4

Coeficientul izometric K_z al descompunerii fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat și supus în condiții de izometrie tetanizărilor directe succesive de cîte 5 sec la 30 sec interval dintre tetanizări. [Datele sînt extrase din tabelele V și VI publicate de D.N. în Biochem. Z., 196, 81 și 82 (1928)]

Nr. crt.	Numărul tetanizări	*L* Lungimea mușchiului (cm)	S.T. Efort *S* (kg) Timp *T* (sec)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_z	Tabela și numărul experienței
1	2	3	4	5	6	7
1	1	3,0	8,8	0,74	27	V, 20
2	1	3,1	9,3	0,81	24	V, 21
3	1	3,0	7,9	0,57	29	V, 22
4	1	3,0	8,0	0,69	26,5	V, 24
	Valori medii		8,5	0,70	26,6	
5	2	3,1	11,0	0,99	24	VI, 1
6	2	2,8	13,4	0,86	39,5	VI, 1
7	2	2,8	13,8	0,89	38	VI, 3
	Valori medii		12,7	0,91	33,8	
8	6	2,9	41,5	1,03	91	VI, 4
9	6	2,9	49,0	0,95	112	VI, 5
	Valori medii		45,2	1,10	101,5	
10	10	2,9	75,7	1,22	138	VI, 6
11	12	3,0	78,5	1,39	116	VI, 7

arată că, între efortul efectuat și descompunerea fosfagenului, nu există nici proporționalitate și nici relații directe.

La aceleași constatări ajungem dacă examinăm și alte rezultate, ca de exemplu cele obținute prin tetanizarea timp de 2 și 5 sec a mușchilor gastrocnemieni de *Bufo marinus* (tabela nr. 5) și *Rana temporaria* (tabela nr. 6). Și aici, eforturilor diferite efectuate de mușchi le corespunde descompunerea acelorași cantități de fosfagen, și anume : la *Bufo*, eforturile de 3,8 și 6,5 kg × sec sînt însoțite de descompunerea a 0,26—0,21 mg H_3PO_4 — fosfagen, iar la *Rana* în decursul eforturilor de 3,4 și 8,5 kg × sec se descompun 0,62—0,70 mg H_3PO_4 -fosfagen. Astfel, însăși datele experimentale obținute de D. Nachmansohn arată că la mușchiul excitat efortul și fosfagenul variază independent unul de altul.

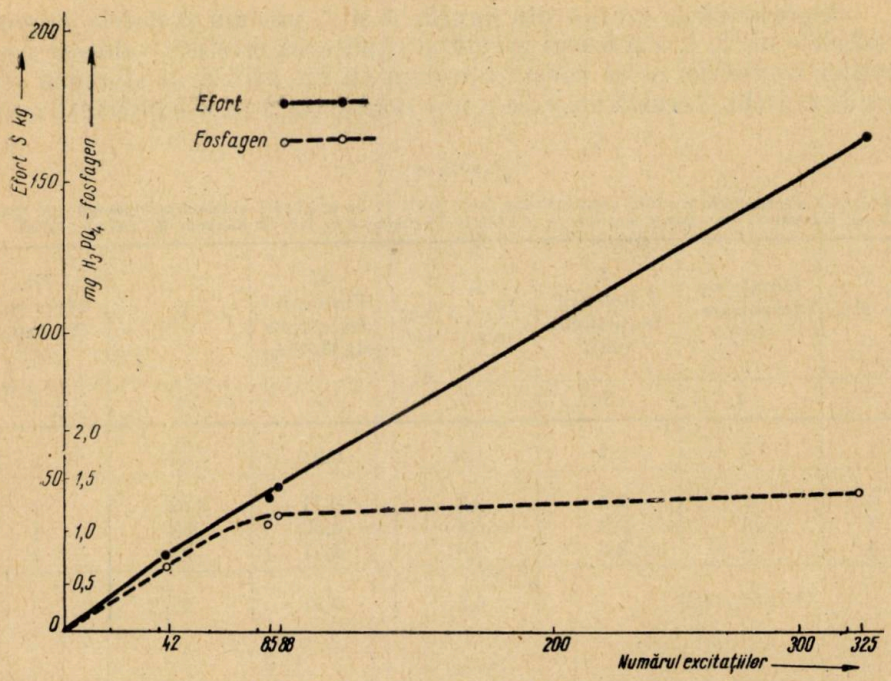


Fig. 1. — Variația travaliului și descompunerii fosfagenului în funcție de numărul excitațiilor la mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat.

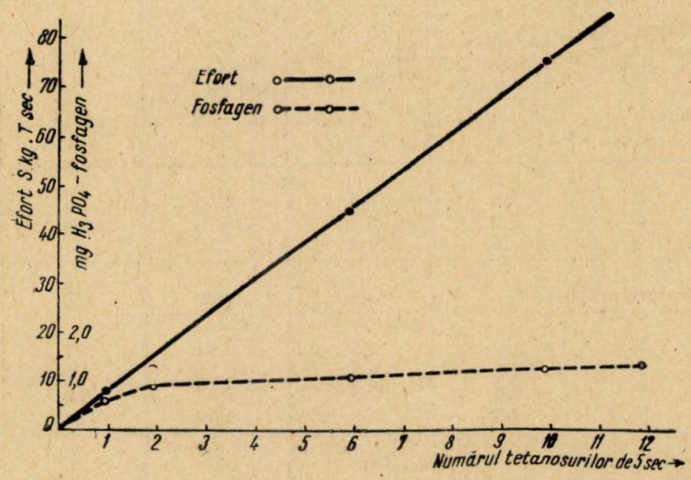


Fig. 2. — Variația travaliului și descompunerii fosfagenului în funcție de numărul tetanizărilor de cîte 5 secunde la mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat.

Reprezentările grafice din figurile 1 şi 2, precum şi datele cuprinse în tabelele nr. 3, 4, 5 şi 6 mai permit şi explicarea creşterii valorilor coeficienţilor izometrici ce se constată o dată cu intensificarea efortului efectuat de muşchi. Această creştere a fost interpretată ca o consecinţă a unei

Tabela nr. 5

Comportarea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Fufo marinus*) normal, izolat și tetanizat o singură dată timp de 2 sec. respectiv 5 sec. [Datele sînt extrase din tabela VI publicată de D.N. în Biochem. Z., 213, 283 (1929).]

Nr. crt.	Durata de tetanizare (sec)	*L* Lungimea mușchiului (cm)	*S.T.* Efort *S* (kg) Timp *T* (sec)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_z	Nr. experienţei din tabela VI
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3,2	3,8	0,26	47	1
2	5	2,8	5,2	0,11	132	2
3	5	2,9	6,8	0,32	62	3
4	5	2,8	7,0	0,21	93	4
Valori medii			6,5	0,21	96	

Tabela nr. 6

Comportarea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat și tetanizat o singură dată timp de 2 sec. respectiv 5 sec. [Datele privind mușchii prelucraţi după 30 sec de refacere sînt extrase din tabelele I şi V publicate de D.N. în Biochem. Z., 208, 239 (1928), respectiv 196, 81 (1928).]

Nr. crt.	Durata de tetanizare (sec)	*L* Lungimea mușchiului (cm)	*S.T.* Efort *S* (kg) Timp *T* (sec)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_z	Tabela şi numărul experienţei
1	2	3	4	5	6	7
1	2	2,8	2,7	0,54	14	I, 3
2	2	3,0	3,4	0,73	14	I, 2
3	2	2,9	4,2	0,58	21	I, 1
Valori medii			3,4	0,62	16	
4	5	3,0	8,8	0,74	27	V, 20
5	5	3,1	9,3	0,81	24	V, 21
6	5	3,0	7,9	0,57	29	V, 22
7	5	3,0	8,0	0,69	26	V, 24
Valori medii			8,5	0,70	26	

„restrîngeri" ipotetice a descompunerii fosfagenului muscular, „restrîngere" care ar fi cu atît mai însemnată cu cît efortul este mai mare. Or, în realitate, creşterea valorii coeficienţilor izometrici se datoreşte nu vr(unei

„restrîngeri" inexplicabile a descompunerii fosfagenului muscular, ci faptului că mărirea numărului de excitații, respectiv prelungirea duratei tetanosului face ca efortul să crească, fără să modifice prea mult descompunerea fosfagenului muscular. Astfel, pe cînd valoarea numărătorului din expresia matematică a celor doi coeficienți crește, valoarea numitorului rămîne practic constantă, ceea ce determină creșterea valorii coeficienților respectivi.

Pe cînd datele cuprinse în tabelele nr. 3, 4, 5 și 6 arată că în anumite împrejurări eforturi diferite sînt însoțite de descompunerea aceleiași cantități de fosfagen, tot în materialul publicat de D. Nachmansohn se găsesc și date după care în anumite împrejurări același efort este însoțit de descompunerea diferitelor cantități de fosfagen. Aceasta se constată, de exemplu, în cazuri cînd mușchii lucrează la temperaturi diferite. Astfel, în mușchiul gastrocnemian supus excitațiilor succesive (tabela nr. 7) la 10° se descompune aproape de trei ori mai puțin fosfagen decît la 24°, și anume 0,23 în loc de 0,64 mg H_3PO_4 — fosfagen, deși în ambele cazuri se efectuează practic același efort de 11—14 kg. Tot așa și în tetanizare (tabela

Tabela nr. 7

Descompunerea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat și supus excitațiilor succesive (30 de excitații în 5 sec) la temperaturi de 10 și 24° C. [Datele sînt extrase din tabela I publicată de D.N. în Biochem. Z., 213, 281 (1929)]

Nr. crt.	Numărul excitațiilor	*L* Lungimea mușchiului (cm)	*S* Efort *S* (kg)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3 Po_4)	K_m	Nr. experienței din tabela I
1	2	3	4	5	6	7
			Temperatura de 10° C			
1	30	2,8	12,8	0,27	130	1
2	30	2,6	10,8	0,19	148	2
3	30	2,7	10,3	0,21	132	3
Valori medii			11,3	0,23	136	
			Temperatura de 24°C			
4	30	2,9	16,5	0,66	72	4
5	30	2,9	13,6	0,66	60	5
6	30	3,1	18,0	0,91	61	6
7	30	3,0	8,3	0,34	72	7
Valori medii			14,1	0,64	66	

nr. 8) : efectuarea efortului de 6,5 kg×sec la 5° este însoțită de descompunerea a 0,31 mg H_3PO_4 — fosfagen, adică de două ori mai puțin decît la 20° cînd se descompune 0,59 mg H_3PO_4 -fosfagen. Rezultă că și în aceste date se oglindește independența dintre descompunerea fosfagenului și efectuarea efortului de către mușchi. Totodată se înțelege că, din moment

ce efortul este constant, coeficienţii izometrici K_m şi K_z sînt cu atît mai mari cu cît cantitatea fosfagenului descompus este mai mică, fapt care în nici un caz nu poate fi interpretat în favoarea existenţei relaţiilor de interdependenţă dintre fosfagen şi efortul muscular.

Tabela nr. 8

Descompunerea fosfagenului în muşchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal, izolat şi tetanizat timp de 5 sec la temperaturi diferite (4—5° şi temperatura camerei); [Datele sînt extrase din tabelele II şi V publicate de D.N. în Biochem. Z., 213, 281 (1929), respectiv 196, 81 (1928). Au fost alese experienţele în care muşchii de lungime 2,7—3,0 cm au efectuat efort de 6—7 kg × sec.]

Nr. crt.	Tetanos sec	L Lungimea muşchiului (cm)	$S \cdot T$ Efort S (kg) Timp T (sec)	M Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_z	Tabela şi numărul experienţei
1	2	3	4	5	6	7
			Temperatura 4 — 5°C			
1	5	2,7	6,1	0,29	57	II, 1
2	5	2,9	6,8	0,28	72	II, 3
3	5	2,9	6,6	0,37	52	II, 4
Valori medii			6,5	0,31	60	
			Temperatura camerei (20° ± 2°C)			
4	5	2,9	6,2	0,75	24	V, 1
5	5	2,7	6,5	0,51	34	V, 3
6	5	2,7	6,4	0,38	45	V, 9
7	5	3,0	6,6	0,73	27	V, 13
Valori medii			6,4	0,59	32	

Acum pot fi înţelese uşor motivele pentru care coeficienţii izometrici nu pot fi aplicaţi la fosfagenul muscular. Se ştie că justeţea concluziilor care se deduc pe bază de coeficienţi depinde în primul rînd de condiţia ca coeficienţii respectivi să exprime corect relaţiile reale dintre variabilele care intră în calculul lor. Or, tocmai în cazul încercărilor de aplicare a coeficienţilor izometrici în domeniul fosfagenului muscular, această condiţie fundamentală nu este satisfăcută : într-adevăr coeficienţii menţionaţi exprimă numai acele relaţii dintre efort şi biochimismul muscular care prezintă caracterul de proporţionalitate, pe cînd în cazul fosfagenului muscular astfel de relaţii nu există. Rezultă că valorile coeficienţilor izometrici, calculate pe baza variabilelor S, L, T şi M, nu au nici o semnificaţie şi de aceea nu pot servi nici la interpretarea rezultatelor experimentale şi nici la fundamentarea concluziilor privind raporturile dintre efort şi fosfagenul muscular.

Acum se poate trece la compararea comportării fosfagenului în muşchii curarizaţi şi cei normali. Dat fiind că curarizarea provoacă o scădere puternică a excitabilităţii musculare, eventualele deosebiri ar putea fi datorite unei interdependenţe posibile dintre excitabilitate şi fosfagen.

Tabela nr. 9

Comportarea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal și curarizat, izolat și supus în condiții de izometrie excitațiilor succesive. [Datele sînt extrase din tabelele III și IV publicate de D.N. în Biochem. Z., 196, 79, respectiv 80 (1928)]

Nr. crt.	Starea mușchiului	*L* Lungimea mușchiului (cm)	*S* Efort *S* (kg)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_m	Tabela și numărul experienței
1	2	3	4	5	6	7
1	normal	3,3	21	0,75	89	III, 1
2	curarizat	3,2	27	0,88	100	IV, 3
3	curarizat	2,9	39	0,90	125	IV, 4
4	normal	3,1	43	1,08	121	III, 3a
5	normal	3,0	47	1,12	125	III, 2

După cum se constată din tabela nr. 9 și mai ales din reprezentarea grafică din figura 3, care cuprind datele experimentale obținute de D. Nachmansohn pe mușchii gastrocnemieni normali și curarizați supuși excitațiilor succesive în condițiile de izometrie, cantitățile de fosfagen descompuse în mușchii curarizați se încadrează în cantitățile descompuse în mușchii normali, așezîndu-se pe aceeași curbă a variației fosfagenului descompus în funcție de numărul excitațiilor primite de mușchi. Aceasta înseamnă că, în condițiile menționate, descompunerea fosfagenului determinată de excitații, nu este influențată de curarizare, adică de scăderea excitabilității mușchiului curarizat.

La aceeași concluzie am ajuns și noi prin cercetări efectuate în condițiile de izotonie și fără încărcare [7]. Într-adevăr, cantitățile de fosfagen descompus în mușchii normali și curarizați, după 600 de excitații succesive apli-

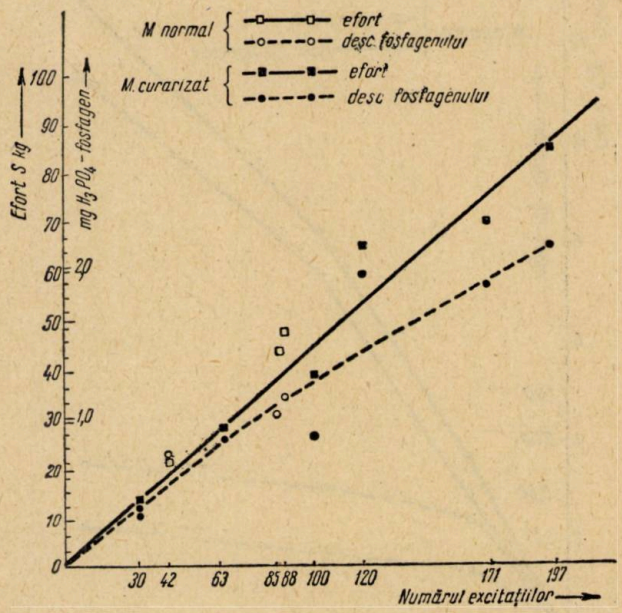


Fig. 3. — Travaliu și comportarea fosfagenului în funcție de numărul excitațiilor la mușchi gastrocnemieni (*Rana temporaria*) normali și curarizați, supuși excitațiilor directe succesive în condițiile de izometrie. Mușchii excitați de 100 și 120 de ori au dat primul valori prea joase, iar celălalt prea ridicate, față de medie.

cate în decurs de 10 min, s-au dovedit a fi destul de apropiate între ele (tabela nr. 10).

Tabela nr. 10

Descompunerea fosfagenului în muşchiul gastrocnemian (*Rana ridibunda*) normal şi curarizat cu flaxedil, izolat şi supus în condiţii de izotonie şi fără încărcare excitaţiilor succesive directe; 600 de excitaţii în 10 min. Septembrie 1961. [Alte determinări: tabela 7 publicată de E.M., C.I. şi C.D. în Studii şi cercetări de biochimie, 4, 182 (1961)]

Nr. crt.	Greutatea muşchiului (g)	Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	Nr. crt.	Greutatea muşchiului (g)	Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)
	Muşchi normali			Muşchi curarizaţi	
1	2	3	4	5	6
1.	0,50	0,51	4.	0,90	0,30
2.	0,80	0,66	5.	0,90	0,81
3.	0,75	0,38	6.	1,10	0,51
Valori medii		0,52	Valori medii		0,54

Rezultă că, la muşchiul gastrocnemian supus excitaţiilor succesive atît în condiţiile de izometrie, cu efectuare de efort (D. Nachmansohn), cît şi în condiţiile de izotonie şi fără încărcare (cercetările noastre), curarizarea şi deci scăderea excitabilităţii nu influenţează în mod apreciabil schimbările nivelului fosfagenului muscular provocate de excitaţii.

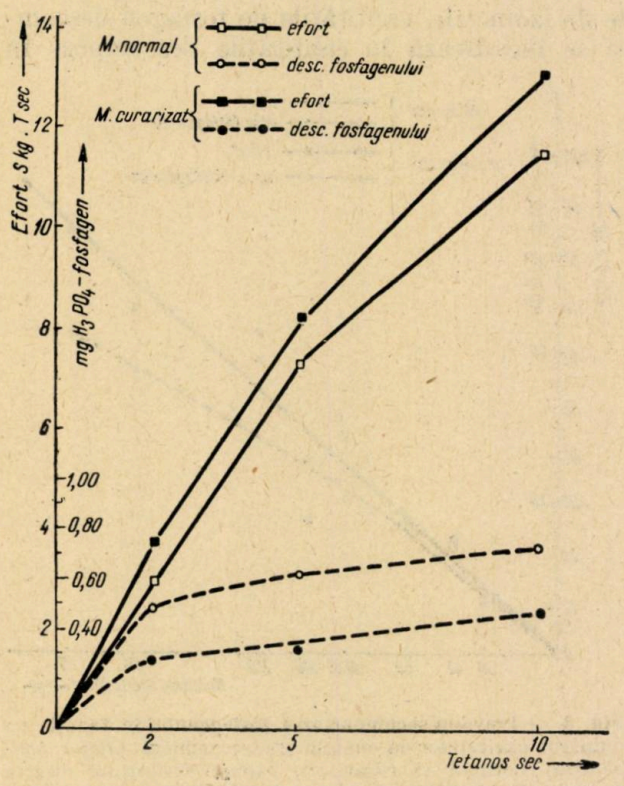


Fig. 4. — Variaţia travaliului şi descompunerii fosfagenului în funcţie de durata tetanosului la muşchi gastrocnemian (*Rana temporaria*), izolat, normal şi curarizat.

Altfel se prezintă situaţia în tetanizare. Datele cuprinse în tabela nr. 11 arată că la tetanizări de 2,5 şi 10 sec, descompunerea fosfagenului în muşchiul curarizat este considerabil mai mică decît în muşchiul normal, însă, după cum rezultă din figura 4, care reprezintă variaţia fosfagenului descompus în funcţie de durata tetanosului, curbele tind spre aceeaşi asimptotă corespunzătoare descompunerii maxime posibile de fosfagen. De aici se desprind două concluzii :

Tabela nr. 11

Comportarea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian (*Rana temporaria*) normal și curarizat, izolat și supus în condițiile de izometrie tetanizărilor de durată diferită. [Datele sînt extrase din tabelele V, I, II, VI, VII și VIII publicate de D.N. în Biochem. Z., 196, 81 (1928) și 208, 239, 241, 246 și 247 (1929) și cuprind numai rezultatele experimentale obținute pe mușchi de 2,8—2,9 cm lungime. Din tabelele I și II sînt extrase datele privind mușchii prelucrați după 30 sec de refacere]

MUȘCHI NORMAL							MUȘCHI CURARIZAT						
Nr. crt.	Durata de tetanizare (sec.)	*L* Lungimea mușchiului (cm)	*S. T.* Efort *S* (kg) Timp *T* (sec)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_z	Tabela și numărul experienței	Nr. crt.	Durata de tetanizare (sec.)	*L* Lungimea mușchiului (cm)	*S. T.* Efort *S* (kg) Timp *T* (sec)	*M* Fosfagen descompus (mg H_3PO_4)	K_z	Tabela și numărul experienței
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	2	2,9	4,2	0,58	21	I, 1	1	2	2,9	2,1	0,08	76	VIII, 1
2	2	2,8	2,7	0,54	14	I, 3	2	2	2,8	4,5	0,33	38	VIII, 3
3	2	2,8	2,2	0,36	17	I, 4	3	2	2,9	4,8	0,44	32	VIII, 6
	Valori medii		3,0	0,49	17			Valori medii		3,8	0,28	49	
4	5	2,9	6,2	0,75	24	V, 1	4	5	2,9	8,2	0,36	66	VI, 2
5	5	2,8	7,8	0,43	50	V, 4	5	5	2,8	7,9	0,29	76	VI, 4
6	5	2,9	8,8	0,50	50	V, 5	6	5	2,9	9,4	0,29	94	VI, 5
7	5	2,9	5,0	0,61	29	V, 6	7	5	2,9	7,5	0,33	66	VI, 6
8	5	2,8	7,1	0,51	39	V, 14	8	5	2,8	9,0	0,38	66	VI, 7
9	5	2,8	8,3	0,74	31	V, 15							
10	5	2,8	7,2	0,67	30	V, 16							
11	5	2,9	8,6	0,83	30	V, 18							
	Valori medii		7,4	0,63	35			Valori medii		8,4	0,33	74	
12	10	2,9	11,9	0,95	36	II, 2							
13	10	2,8	11,9	0,72	46	II, 3							
14	10	2,8	14,8	0,90	46	II, 4	9	10	2,9	13,9	0,43	94	VII, 1
15	10	2,8	9,5	0,50	62	II, 5	10	10	2,9	12,7	0,55	67	VII, 4
16	10	2,8	11,0	0,70	54	II, 6							
17	10	2,8	10,3	0,58	58	II, 7							
	Valori medii		11,6	0,73	50			Valori medii		13,3	0,49	80	

În primul rînd, rezultă că, în caz de tetanizare, excitaţia excesivă a muşchiului, şi deci realizarea unei stări de oboseală înaintată, duc la aceeaşi descompunere maximă posibilă de fosfagen, indiferent dacă muşchiul este normal sau curarizat (deci independent de gradul lui de excitabilitate) şi indiferent dacă această excitare excesivă se realizează prin tetanizare în condiţiile de izometrie cu efectuare de efort (D. Nachmansohn) sau prin excitaţii succesive în condiţii de izotonie fără efort (experienţele noastre). Această concluzie confirmă unele prevederi expuse în lucrarea precedentă [8].

În al doilea rînd, rezultă că curarizarea exercită un anumit efect asupra descompunerii fosfagenului muscular, şi anume o micşorează, ceea ce se constată uşor la muşchii tetanizaţi. Efectul acesta însă nu depinde de efortul muscular : figura 4 arată că, atît la muşchiul normal, cît şi la cel curarizat, efortul şi descompunerea fosfagenului variază independent. Înseamnă că nici aici coeficientul izometric K_z nu poate fi folosit, pentru interpretarea rezultatelor experimentale. Ca şi în exemplele precedente, creşterea valorii coeficientului K_z de la 17 la 35 şi apoi la 50 la muşchi normal, de la 49 la 74 şi apoi la 80 la muşchiul curarizat (tabela nr. 11) nu reprezintă o consecinţă a vreunei „restrîngeri" a descompunerii fosfagenului muscular condiţionată de efortul efectuat de muşchi, ci prelungirii duratei tetanosului, adică a valorii factorului timp din formulele care exprimă aceşti coeficienţi. În ceea ce priveşte însă micşorarea gradului de descompunere a fosfagenului la muşchii curarizaţi, aceasta se datoreşte curarizării ca atare şi nu unei acţiuni indirecte prin intermediul efortului efectuat.

Din întregul material prezentat în această lucrare, rezultă că *nivelul fosfagenului din muşchi variază independent de efortul efectuat şi, în consecinţă, nu există relaţii directe între descompunerea fosfagenului şi efortul muscular*. De aceea, coeficienţii izometrici K_m şi K_z nu pot fi aplicaţi în cazul fosfagenului, iar valorile lor calculate pe baza variabilelor S, L, T, şi M nu au nici o semnificaţie şi nu pot servi la interpretarea rezultatelor experimentale.

Prezentată la redacţie la 7 ianuarie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.

ИЗОМЕТРИЧЕСКИЕ КОЭФФИЦИЕНТЫ И СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ НАПРЯЖЕНИЕМ И МЫШЕЧНЫМ ФОСФАГЕНОМ

РЕЗЮМЕ

Исследования, проведенные на икроножной мышце лягушки в изотонических условиях и без нагрузки, показали, что между разложением фосфагена и напряжением мышцы не существуют прямые связи, потому что содержание фосфагена в мышце изменяется независимо от напряжения. Эти факты были в противоречии с заключениями

Д. Нахманзона. Имея в виду, что в первом случае интерпретация экспериментальных данных была сделана на основе количества разложенного фосфагена, а во втором случае на основе изометрических коэффициентов, не была исключена возможность, что указанные расхождения появлялись по этой причине.

При перерассмотрении экспериментального материала, опубликованного Д. Нахманзоном, было установлено, что интерпретация этого материала на основе количества разложенного фосфагена приводит к тем же самым заключениям, к которым пришли и мы. Значит, экспериментальные данные, полученные Д. Нахманзоном, совпадают с нашими. Также было установлено, что ошибочный вывод о связи между разложением фосфагена и мышечным напряжением является результатом факта, что интерпретация экспериментальных результатов, полученных в изометрических условиях, была сделана на основе изометрических коэффициентов. Известно, что правильность заключений, выведенных на основе коэффициентов, зависит от правильности отношений между этими коэффициентами, и переменными, которые входят в их вычисление. Имея в виду, что изометрические коэффициенты выражают только те отношения между напряжением и мышечным биохимизмом, которые имеют пропорциональный характер, они не могут быть применены в случае фосфагена, потому что между разложением этого вещества и мышечным напряжением не существуют прямые связи. Следовательно, в случае фосфагена изометрические коэффициенты не имеют значение и не могут служить для интерпретации экспериментальных данных.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение работы и разложение фосфагена в зависимости от числа возбуждений изолированной икроножной мышцы (*Rana temporaria*) в нормальном состоянии.

Рис. 2. — Изменение работы и разложение фосфагена в зависимости от числа 5-ти секундных тетанических раздражений изолированной икроножной мышцы (*Rana temporaria*) в нормальном состоянии.

Рис. 3. — Работа и поведение фосфагена в зависимости от числа возбуждений икроножной мышцы (*Rana temporaria*) в нормальном и кураризированном состоянии, подвергнутой прямыми, последовательными раздражениями в изометрических условиях. 100 и 120 раздражений мышцы дали, первые слишком низкие, а вторые слишком высокие данные, сравнительно со средними значениями.

Рис. 4. — Изменение работы и разложение фосфагена в зависимости от времени тетаноса изолированной икроножной мышцы (*Rana temp rariu*) в нормальном и кураризированном состоянии.

LES COÉFFICIENTS ISOMÉTRIQUES ET LES RELATIONS ENTRE L'EFFORT ET LE PHOSPHAGÈNE MUSCULAIRE

RÉSUMÉ

Les recherches effectuées sur le muscle gastrocnémien de grenouille dans les conditions d'isotonie et sans charge, ont montré que, entre la décomposition du phosphagène et l'effort effectué par le muscle il n'existe

pas de relations d'interdépendance directe, le niveau du phosphagène dans le muscle variant indépendamment de l'effort musculaire. Ces constatations se trouvaient en discordance avec les conclusions de D. Nachmansohn, qui avait effectué ses recherches dans des conditions d'isométrie, avec accomplissement de travail. Comme, dans le premier cas, l'interprétation des résultats expérimentaux a été faite en prenant pour base les quantités de phosphagène décomposé et, dans le deuxième cas, en prenant pour base les coefficients isométriques, il n'était pas exclu que les divergences signalées fussent dues précisément à cette cause.

Par conséquent, on a réexaminé le matériel expérimental publié par D. Nachmansohn, et l'on a constaté que l'interprétation de ce matériel, en prenant pour base les quantités de phosphagène décomposé, mène aux mêmes conclusions que les nôtres. Cela signifie que les données expérimentales de D. Nachmansohn concordent avec les nôtres. À cette occasion, l'on a constaté que la conclusion erronée concernant les relations entre la décomposition du phosphagène et l'effort musculaire est due au fait que l'interprétation des résultats expérimentaux obtenus dans les conditions d'isométrie a été faite sur la base des coefficients isométriques. L'on sait, en effet, que la justesse des conclusions qui se déduisent sur la base de coefficients, dépend de la condition que les coefficients respectifs expriment correctement les relations entre les variables qui entrent dans leur calcul. Mais, comme les coefficients isométriques n'expriment que ces relations entre l'effort et le biochimisme musculaire qui présentent un caractère de proportionnalité, ils ne peuvent s'appliquer dans le cas du phosphagène, puisque, entre la décomposition de cette substance et l'effort musculaire il n'existe pas de relations de dépendance directe. Par conséquent, dans le cas du phosphagène, les coefficients isométriques n'ont aucune signification et ne peuvent servir à l'interprétation des résultats expérimentaux.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — La variation du travail et de la décomposition du phosphagène en fonction du nombre d'excitations dans le muscle gastrocnémien (*Rana temporaria*), normal, isolé.

Fig. 2. — La variation du travail et de la décomposition du phosphagène en fonction du nombre de tétanisations de 5 secondes chacune, dans le muscle gastrocnémien (*Rana temporaria*) normal, isolé.

Fig. 3. — Le travail et le comportement du phosphagène en fonction du nombre d'excitations, dans les muscles gastrocnémiens (*Rana temporaria*), normaux et curarisés, soumis aux excitations directes successives, dans des conditions d'isométrie. Les muscles excités 100 et 120 fois ont donné, le premier des valeurs trop faibles et le deuxième des valeurs trop élevées, par rapport à la moyenne.

Fig. 4. — La variation du travail et de la décomposition du phosphagène en fonction de la durée du tétanos dans le muscle gastrocnémien (*Rana temporaria*), isolé, normal et curarisé.

BIBLIOGRAFIE

1. O. MEYERHOF, *Chimie de la contraction musculaire*, Delmas Bordeaux, Hermann et C-ie, Paris, 1932, p. 263.
2. O. MEYERHOF, *Die Energieumwandlungen in Muskel. V. Mitteilung. Milchsäurebildung und mechanische Arbeit*, Pflügers Archiv, **191**, 128 (1921).

3. J. PARNAS, *Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. VI. Zusammenhang der Ammoniakbildung mit der Umwandlung des Adeninnucleotides zu Inosinsäure.* Biochem. Z., **206**, 16 (1929).
4. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. I.*, Biochem. Z., **196**, 73—97 (1928); *a* — 80.
5. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. II.*, Biochem. Z., **208**, 237—256 (1929).
6. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. III.*, Biochem. Z., **213**, 262—300 (1929); *a* — 262; *b* — 276; *c* — 263.
7. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate și excitabilitate musculară*, Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *2*, 171—185 (1961); *a* — 178; *b* — 182.
8. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului*, Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *2*, 207—218 (1962).
9. G. LANGE, *Über die Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat während der Kontractionsphase von Froschrektusmuskeln*, Biochem. Z., **326**, 172 (1955).
10. A. YUICHI., *Studies on phosphocreatine in the skeletal muscle. VII. Relation between the frequency of muscular contraction and the phosphocreatine consumption*, C.A., 4844 *f* (1947).

CONTRIBUȚII LA STUDIUL CORELAȚIEI BIOCHIMICE DINTRE VÎRSTĂ ȘI ATEROSCLEROZĂ*)

DE

S. OERIU

MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

și E. MÎRZA

În stadiul actual al științelor medicale, ateroscleroza nu este considerată ca o boală a vîrstei înaintate [1—4]. Ateroscleroza s-a găsit la oameni tineri, la adolescenți (Ținserling [5], Hause [6], Cook [7], Blok [8]), la copii de diferite vîrste și chiar la noii-născuți (Kube și Soloviov [9]), iar ateroscleroza experimentală s-a putut reproduce la animale tinere, la pui (Gertler [10], Nichols [11]) și la iepuri tineri (Nasledova și Rafaliski [12] și Surikov [13]).

Cu toate acestea, se știe că depunerea de lipide și intensitatea modificărilor aterosclerotice în aortă se accentuează, cu vîrsta, iar în sînge crește colesterolemia.

Rafaliski și Nasledova [12], în cercetările lor, privind influența factorului vîrstă asupra dezvoltării aterosclerozei la iepuri, ajung la concluzia că ateroscleroza se reproduce mai ușor și mai repede la animale mai în vîrstă; în aceste cazuri, dezvoltarea aterosclerozei este mai intensă, iar indicii biochimici ai aterosclerozei sînt mai pronunțați.

Pornind de la ipoteza că ateroscleroza ar sta în relație cu vîrsta și că modificările biochimice legate de vîrstă stimulează aterogeneza; de asemenea că în funcție de vîrstă se produc tulburări în metabolism, în special în procesele de oxidoreducere, care se manifestă prin acumularea de grupări disulfidice [14] [15], ne-am propus să cercetăm indicii biochimici ai aterosclerozei la iepuri de diferite vîrste și la iepuri cu ateroscleroză experimentală, pentru a vedea dacă există o relație între modificările biochimice ale procesului de îmbătrînire și cele din aterogeneză.

*) Lucrare prezentată la Conferința internațională de gerontologie, Budapesta, octombrie 1962.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru cercetarea modificărilor biochimice în funcţie de vîrstă s-au folosit 246 de iepuri şi anume :

— tineri, impuberi, în vîrstă de 1½—2 luni, în greutate de 700—1 000 g (88 de animale) ;

— adulţi în perioada de reproducere, în vîrstă de 10—12 luni, în greutate de 2—3 kg (76 de animale) ;

— bătrîni şi în perioada de îmbătrînire, în vîrstă de 2 ani şi mai mult, în greutate de 3—4 kg (82 de animale).

Pentru reproducerea aterosclerozei, ne-au servit iepuri în vîrstă de 10—12 luni, în greutate de 3—4 kg (20 de iepuri).

Pentru reproducerea aterosclerozei s-a folosit metoda clasică a lui N. N. Anicikov ; colesterolul s-a administrat *per os*, zilnic, în doză de 0,2 g/kg corp. Durata experienţei : 106 zile.

La aceste animale s-a determinat în sînge concentraţia următoarelor substanţe :

— lipidele totale — metoda gravimetrică ;

— colesterolul total şi esterificat — metoda Grigaut [16] ;

— fosfolipidele — metoda Fiske-Subarow [17] ;

— fracţiunile proteice şi lipoproteice — metoda electroforezei pe hîrtie ;

— acizii graşi saturaţi şi polinesaturaţi — metoda Pikaar-Nijhof [18] ;

— aminoacizii — metoda cromatografiei pe hîrtie după Racinski [19], Savoia [20] şi Barrolier [21] ;

— glutationul total, redus şi oxidat — metoda Woodward-Fry [22] ;

— mucopolizaharidele — hexozamina după Elson Morgan [23] ;

hexozele totale legate de proteine, prin conţinutul în hexoză, după Weiner şi Moshin [24] ; acidul sialic după Diesche fucoza după Diesche şi Shettle [26].

REZULTATE

Confruntarea datelor biochimice (tabela nr. 1) arată modificări biochimice importante, atît în procesul de îmbătrînire, cît şi în procesul de aterogeneză.

Modificările biochimice merg, în ambele cazuri, în acelaşi sens, însă sub acţiunea dozelor mari de colesterol alimentar, care influenţează metabolismul biochimic în general şi în special pe cel lipidic, gradul de creştere a fracţiunilor lipidice din sînge este deosebit de ridicat în ateroscleroza experimentală, ceea ce se manifestă prin modificări importante ale indicilor aterosclerozei.

Indicele colesterol/lipide creşte la animalele bătrîne, faţă de cele tinere, de la 0,13 la 0,20, iar în ateroscleroză pînă la 0,40.

Indicele fosfolipide/colesterol scade la animalele bătrîne, faţă de animalele tinere, de la 2,10 la 1,23, iar în ateroscleroză pînă la 0,52.

Indicele *beta* — lipoproteine/*alfa*-lipoproteine creşte la animalele bătrîne de la 1,56—1,90, iar în ateroscleroză pînă la 5,30.

Concentraţia acizilor graşi saturaţi creşte la animalele bătrîne de la 271 la 367 mg%, iar în ateroscleroză pînă la 580 mg%.

Metabolismul mucopolizaharidelor suferă de asemenea modificări la amîndouă grupele de animale. Cercetarea unor fracţiuni glicoproteice

neutre arată o creștere a acidului sialic, a fucozei, a hexozei și a hexozaminei, legate de proteine în serul sanguin.

Aceste date coincid cu datele obținute de Gero și colaboratorii [27] în ateroscleroză și cu cele observate de Schwartz și Gilmore [28], care

Tabela nr. 1

Valorile medii ale unor compuși și a unor indici biochimici la iepuri cu ateroscleroză experimentală și la iepuri martori de diferite vîrste

Determinări biochimice	Iepuri martori			Iepuri adulți cu ateroscleroză experimentală
	Tineri	Adulți	Bătrîni	
	Lipide			
Lipide totale (mg%)	520,00	680,00	650,00	1 370,00
Colesterol total (mg%)	67,53	68,77	114,25	553,00
Colesterol esterificat (mg%)	36,49	34,26	56,37	387,00
Fosfolipide (mg%)	142,50	198,00	140,50	289,00
Lipoproteine-alfa (%)	39,10	—	34,10	15,8
Lipoproteine-*beta* + *beta*-lent (%)	60,90	—	65,90	84,20
Indice colesterol/lipide	0,13	0,10	0,20	0,40
Indice colesterol esterificat/colesterol total	0,55	0,49	0,49	0,69
Indice fosfolipide/colesterol	2,10	2,90	1,23	0,52
Indice lipoproteine-*beta*/*alfa*-lipoproteine	1,56	—	1,90	5,30
Acizi grași totali (mg%)	383,00	500,00	453,00	740,00
Acizi grași saturați (mg%)	271,46	387,00	367,23	680,00
Acizii grași polinesaturați (mg%)				
Acid hexaenoic	3,70	3,55	2,90	2,79
Acid pentaenoic	2,45	2,56	1,79	1,71
Acid arachidonic	10,60	10,30	9,00	10,40
Acid linolenic	5,10	5,00	5,08	4,57
Acid linoleic	89,60	91,50	77,00	125,00
	Mucopolizaharide (mg%)			
Acid sialic	0,123	0,132	0,174	0,204
Hexoză	105,00	117,70	158,00	190,00
Hexozamină	41,00	92,27	67,25	96,40
Fucoză	14,74	16,90	16,70	22,50
Seromucoid	15,90	12,65	40,50	12,20
	Proteine			
Albumine (%)	51,70	43,50	46,30	44,00
Globuline-*alfa* (%)	16,40	18,20	14,10	14,40
Globuline-*beta* %	15,60	19,50	17,80	12,10
Globuline-*gama* (%)	15,10	19,60	19,50	21,76
Glutation total (mg%)	39,65	47,34	42,90	45,80
Glutation redus (mg%)	34,82	40,52	33,40	37,60
Glutation oxidat (mg%)	4,83	6,82	9,40	8,20
	Acizi aminați totali ($g^0/_{00}$)			
Cistină	7,00	7,00	7,90	6,50
Cisteină	5,00	4,40	3,90	3,40
Metionină	4,00	2,40	3,00	1,80
Acid aspartic	7,50	6,00	6,00	5,50
Acid glutamic	25,00	19,40	18,60	18,00

au găsit o creştere a concentraţiei hexozaminei la oameni în vîrstă şi una deosebit de mare în ateroscleroză.

Creşterea acestor fracţiuni glicoproteice se explică prin depolimerizarea mucopolizaharidelor din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, ceea ce are o importanţă deosebită în patogeneza aterosclerozei.

Tulburările în metabolismul proteinelor se manifestă la animalele bătrîne şi în ateroscleroză prin scăderea concentraţiei procentuale a fracţiunilor albuminei şi *alfa*-globulinelor şi prin creşterea procentuală a concentraţiei *gamma*-globulinelor, ca şi prin modificări cantitative ale unor aminoacizi, din care trebuie să remarcăm scăderea metioninei şi a cisteinei.

Creşterea glutationului oxidat în ambele grupe oglindeşte tulburări în procesul de oxido-reducere.

CONCLUZII

Modificările biochimice în procesul de îmbătrînire se produc în acelaşi sens ca şi în procesul de aterogeneză.

Sub influenţa dozelor mari de colesterol, care influenţează asupra metabolismului întreg şi mai ales asupra metabolismului lipidic, modificările fracţiunilor lipidice sînt deosebit de mari în ateroscleroză.

Modificările biochimice care au loc în procesul de îmbătrînire stimulează probabil dezvoltarea aterosclerozei la animalele bătrîne şi astfel se explică de ce ateroscleroza experimentală se reproduce mai uşor la animalele în vîrstă, decît la cele tinere, de ce leziunile de ateroscleroză în aortă sînt mai intense la animalele bătrîne şi de ce ateroscleroza este mai frecventă la oameni bătrîni, fără a fi îndrituită concluzia că ateroscleroza este o boală a bătrîneţii.

Prezentată la redacţie la 28 ianuarie 1963

Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.

К ВОПРОСУ ОБ ИЗУЧЕНИИ БИОХИМИЧЕСКОГО СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ВОЗРАСТОМ И АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

РЕЗЮМЕ

В процессе старения биохимические изменения протекают в том же направлении, как и в процессе атерогенезиса. Под влиянием больших количеств холестерина, которые влияют на обмен в целом и , в особенности на липидный обмен, изменения липидных фракций особенно значительны при атеросклерозе. По-видимому, биохимические изменения, которые происходят в процессе старения, стимулируют развитие атеросклероза у старых особей и этим объясняется, почему экспериментальный атеросклероз легче воспроизводится у старых, чем у молодых

особей, почему поражения аорты, как следствие атеросклероза, более интенсивны у старых особей и почему атеросклероз чаще встречается у старых людей. Отсюда, однако, не следует делать вывода, что атеросклероз является болезнью старости.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA CORRÉLATION BIOCHIMIQUE ENTRE L'ÂGE ET L'ATHÉROSCLÉROSE

RÉSUMÉ

Les modifications biochimiques dans le processus de vieillissement se produisent dans le même sens que dans le processus d'athérogenèse. Sous l'effet des grandes doses de cholestérol qui influent sur le métabolisme tout entier, mais surtout sur le métabolisme des lipides, les modifications des fractions lipidiques sont particulièrement importantes dans l'athérosclérose. Les modifications biochimiques qui surviennent dans le processus de vieillissement stimulent probablement le développement de l'athérosclérose chez les vieux animax. Cela explique pourquoi l'athérosclérose expérimentale peut être provoquée plus aisément chez les animaux âgés que chez les jeunes animaux ; pourquoi les lésions d'athérosclérose dans l'aorte sont plus intenses chez les sujets âgés et pourquoi l'athérosclérose est plus fréquente chez les hommes âgés, sans justifier pourtant la conclusion que l'athérosclérose est une maladie de la vieillesse.

BIBLIOGRAFIE

1. Н. Н. Аничков, Вестник Акад. Мед. Наук СССР, **II**, 29 (1961).
2. А. Л. Мясников, Атеросклероз, Медгиз, Москва, 1960.
3. P. Favarger, *Le rôle du cholestérol dans l'athéromatose*, Exp. Ann. Biochim. Méd., **XV**, 93 (1953).
4. A. Moga, S. Haragus, G. Vagaunescu, R. Vlaicu, *Stadiul actual în etiopatogenia, profilaxia și tratamentul aterosclerozei*, în *Actualități medicale*, Ed. med., București, 1961, p. 130.
5. В. Д. Цинсерлинг, Сборник Научных Тр. в честь 50-летия научной деят. проф. Нечаева, **2**, 468 (1922).
6. V. A. Hause, G. S. Anteli, Arch. Pathology, **44**, 82 (1947).
7. C.D. Cook, H. L. Smith, C. W. Giesen, G. S. Berdez, Am. J. Dis. Child., **73**, 326 (1947).
8. W. M. Blook, R. L. Jackson, G. Stearn, M. P. Butsch, Pediatrics, **1**, 733 (1948).
9. Н. Н. Кубе, С. Соловьев, Архив. Биолог. Наук, **26**, 163 (1929).
10. M. M. Gertler, B. S. Openheimer, Geriatria, **157**, 221 (1954).
11. C. V. Nichols, S. Lindsay, I. L. Chaicoff, Proc. Soc. Exp. Biol., **40**, 177 (1957).
12. И. Д. Наследова, Я. Д. Рафальский, Бюл. эксп. Биол. и Мед., **5**, 32 (1962).
13. М. П. Суриков, Г. В. Смирнова, Ю. А. Лебедев, Г. С. Морозкина, *Фармакология и токсикология*, 1961, 5.
14. C. I. Parhon, S. Oeriu, Studii și cercetări de biochimie, **II**, 4, 359 (1959).
15. S. Oeriu, Rev. Sci. Méd., **VI**, *3—4*, 191 (1961).

16. J. LOISELEUR, *Technique de Laboratoire*, Ed. Masson, Paris, 1954.
17. H. C. FISKE, Y. SUBAROV, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1926).
18. N. A. PIKAAR, J. NIJHOF, Biochem. J., **70**, *1*, 52 (1958).
19. В. В. РАЧИНСИЙ, Успехи химии, **I**, 13 (1950).
20. F. SAVOIA, Il Farmaco, **XIII**, *11*, 598; 608; 612 (1958).
21. J. BARROLLIER, Naturwissenschaft, **42**, 416 (1955).
22. G. E. WOODWARD, E. D. FRY, J. Biol. Chem., **97**, 465 (1932).
23. C. REMINGTON, Biochem. J., **34**, 931 (1940).
24. I. R. MOSHIN, Am. Rev. Tuberc., **68**, 594 (1952).
25. Z. DIESCHE, *Methods of Biochemical Analysis*, Acad. Press, N. Y., 1955.
26. Z. DIESCHE, L. B. SHETTLE, J. Biol. Chem., **175**, 595 (1958).
27. С ГЕРО, К. ФАРКАС, В. ГЕРГЕЛИ, Л. ЯКАБ, Вестник А. М. СССР, **3**, 20 (1961)
28. C. I. SCHWARTZ, H. R. GILMORE, Circulation, **18**, *2*, 191 (1958).

ACTIVITATEA POLAROGRAFICĂ A PROTEINELOR SERICE ŞI FILTRATELOR SULFOSALICILICE, LA DIFERITE SPECII DE ANIMALE

DE

L. M. BURUIANĂ şi V. PAVLU

Importanţa crescîndă care se acordă glucoproteinelor în toate reacţiile specifice ale lichidelor şi ţesuturilor biologice, ridică probleme noi cu privire la identificarea şi dozajul lor.

Se admite în general că aceşti compuşi se pot împărţi în două clase principale :

1) mucoproteinele, în care gruparea glucidică, mucopolizaharidul, este legată polar de proteină, ca în nucleoproteine ; şi

2) mucoidele, în care gruparea glucidică este legată covalent de proteină.

Această împărţire este prea rigidă, după cum reiese din numeroasele şi recentele cercetări privind constituţia glucoproteinelor. O însuşire esenţială a acestor proteide este aceea că ele sînt solubile în acizii percloric, sulfosalicilic şi tricloracetic şi insolubile în acizii fosfotungstic şi metafosforic. La pH 4,5 , au un puternic caracter acid, ccea ce uşurează separarea lor în cîmpul electric.

Mobilitatea electroforetică a glucoproteinelor din ser este foarte apropiată de aceea a α_1 şi α_2-globulinelor, cu care se şi confundă de multe ori. De asemenea, ele se şi desemnează cu denumirile de α_1 şi α_2-glucoproteine, denumiri care înlocuiesc pe acelea de fracţiunea M_1 şi M_2 sau MP_1, MP_2, MP_3 etc. α_1 şi α_2-glucoproteinele nu sînt unitare, ele putînd fi fracţionate în mai mulţi componenţi care se deosebesc mai ales prin ozele conţinute în gruparea glucidică. Deoarece în unele maladii ca : tuberculoza, cancerul, reumatismul, colagenozele etc., glucoproteinele cresc în sînge, glucidograma (cantitatea şi raportul dintre ozele componente ale grupării glucidice) a căpătat o importanţă deosebită în clinică. Despecificarea plasmei sanguine constă mai ales în modificarea cantitativă şi cali-

tativă a glucoproteinelor [8]. Operaţia poate fi deci controlată analizînd această fracţiune.

În lucrarea de faţă s-a cercetat comportarea proteinelor din serul sanguin şi a filtratelor care se obţin după precipitarea lor cu acid sulfosalicilic. În acest fel, se poate urmări variaţia glucoproteinelor serice şi, implicit, modificările care apar în decursul procesului de ameliorare a raselor de animale sau al unor stări patologice.

MATERIAL ŞI METODE

S-a utilizat serul recoltat de la 6 specii de animale sănătoase, adulte, şi anume : găină, vacă, cal, porc, oaie şi cîine. Pentru o analiză mai amănunţită au fost cercetate separat cele două categorii principale de proteine serice, albumina şi globulinele. Acestea erau separate prin precipitare cu sulfat de amoniu, iar după filtrare şi spălare cu o soluţie de sulfat de amoniu 50% saturaţie se dizolvau în apă şi se dializau pînă la dispariţia anionului sulfuric. Final, se dializau contra unei soluţii de tampon fosfat pH 7 şi $\mu = 0{,}1$. Albumina se precipita mai departe din filtrat la saturaţie cu sulfat de amoniu solid, iar după filtrare se spăla cu o soluţie saturată de sulfat de amoniu. După solvire, se dializa ca şi în cazul globulinelor. Analiza electroforetică a fracţiunilor astfel izolate arăta de obicei 3 benzi pentru soluţia de globuline şi o singură bandă pentru soluţia de albumină. Se consideră că acest procedeu de separare asigură de asemenea şi diferenţierea glucoproteinelor, care sînt asociate cu cele două categorii de proteine serice.

Analiza calitativă a glucoproteinelor s-a făcut cu ajutorul metodei polarografice. Waldschmidt-Leitz [9] a fost primul care a stabilit că activitatea polarografică a filtratelor sulfosalicilice — în cazul serului — se datoreşte glucoproteinelor. Numeroase cercetări în această direcţie au confirmat observaţia făcută.

S-a utilizat următoarea tehnică pentru obţinerea filtratelor sulfosalicilice. Se amestecau 2 ml soluţie de proteină cu 1/10 din volum KOH M/1. Se lăsau 30 de minute la temperatura camerei şi apoi se precipita proteina cu un volum egal de acid sulfosalicilic 20%. După agitare, se lăsa 10 minute şi apoi se filtra pe hîrtie. În filtrat se găseau glucoproteinele din fracţiunea proteică cercetată. Se înregistra polarograma soluţiei proteice înainte de precipitare şi aceea a filtratului sulfosalicilic. Soluţia suport era cea indicată de Brdička cu următoarea compoziţie :

$$10^{-3}\text{M Co } (NH_3)_6Cl_3 + 0{,}1 \text{ M } NH_4Cl + 1 \text{ M } NH_4OH$$

în care se punea pentru 5 ml o cantitate de 0,5 ml (sau 0,1 ml în cazul soluţiilor foarte active) de soluţie proteică sau filtrat. Se trasa şi polarograma martor a soluţiei suport. Determinările polarografice au fost făcute cu polarograful Heyrovsky Tip V—301, prevăzut cu adaptorul Pavlu-Schechter.

REZULTATE OBŢINUTE

În polarogramele*) prezentate în figurile 1—8 sînt redate unele din rezultatele mai semnificative.

I. — *Proteinele serice de pasăre* (găini de rasă Rhode Island şi Leghorn). Din figurile 1 şi 2 se constată că treptele catalitice ale globulinelor sînt mai înalte decît ale albuminelor, deşi Homolka (citat după [2]) afirmă că polaractivitatea albuminei din serul sîngelui este de două ori mai mare

*) Sensibilitate : 1/150.

decît a globulinelor. Activitatea polarografică a filtratului sulfosalicilic este mai mare în cazul globulinelor decît al albuminelor.

II. — *Proteinele serice de porc.* În acest caz, activitatea polarografică a albuminei este mai mare decît a globulinelor (fig. 3 și 4).

În schimb, activitatea filtratului sulfosalicilic este mai mare în cazul albuminei decît al globulinelor. În conformitate cu cercetările lui Kalous [7], activitatea polarografică maximă ar trebui să se întîlnească în cazul filtratului globulinic, deoarece majoritatea glucoproteinelor serice sînt asociate cu fracțiunile α_1 și α_2-globulinice. Menționăm că rezultatele lui Kalous au fost obținute în cazul serului uman.

III. — *Proteinele serice de cîine.* La această specie activitatea polarografică a globulinelor este mai mare decît a albuminei.

Așa cum reiese din figurile 5 și 6, atît filtratul fracțiunii albuminice, cît și al celei globulinice sînt polarografic active.

IV. — *Proteinele serice de vacă.* Activitatea polarografică a albuminei este mai mare decît a globulinelor (fig. 7 și 8).

Filtratele sulfosalicilice de albumină și globuline sînt aproape inactive.

Datele obținute cu ocazia acestor cercetări au fost totalizate în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Activitatea polarografică a fracțiunilor proteice și a filtratelor sulfosalicilice la diferite specii de animale

Specia	Raportul dintre înălțimea treptelor proteice	Activitatea filtratului sulfosalicilic	
		Albumina	Globuline
Găină	$A \ll G$	+	+++
Porc	$A > G$	++	+
Cîine	$A < G$	++	++
Vacă	$A > G$	±	±
Cal	$A \gg G$	++	±
Oaie	$A > G$	+	±

DISCUȚII

Comparînd diferitele polarograme obținute și ținînd seama de concentrația în proteine, se constată că activitatea albuminei este mai mare decît a globulinelor la următoarele specii : cal, porc, oaie și vacă. La păsări și cîine, din contră, activitatea globulinelor este mai mare decît a albuminelor. În ceea ce privește activitatea filtratelor sulfosalicilice, se observă că în toate cazurile ea este mult mai mică decît a soluției proteice din care a provenit. Rezultă că participarea mucoproteinelor la mobilizarea catalitică a hidrogenului este minimă.

Mai departe, în conformitate cu cercetările de pînă acum, ar fi trebuit ca activitatea fracțiunii globulinice, care include majoritatea proteinelor serice, să fie mai mare decît a albuminelor. Se constată însă că ambele fracțiuni dau filtrate active. În cazul albuminei această activitate descrește în ordinea : cal, cîine, porc, găină, oaie și vacă, iar în cazul globulinelor în ordinea : găină, cîine, porc, oaie, vacă și cal.

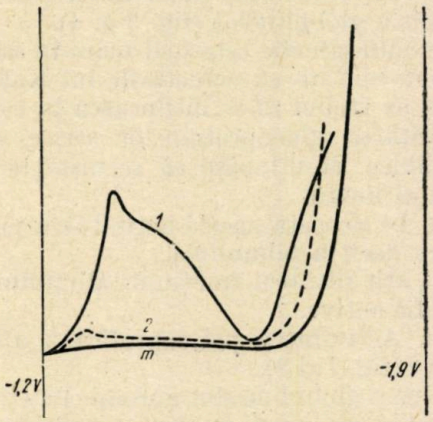


Fig. 1. — *Polarograma albuminei de pasăre (găină).* Conc. în proteină : 22 mg% ; *m* = martor, polarograma soluţiei suport ;
1 = sol. albumină ; *2* = filtratul sulfosalicilic.

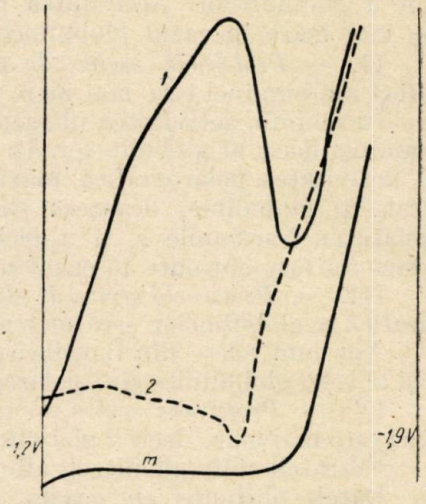
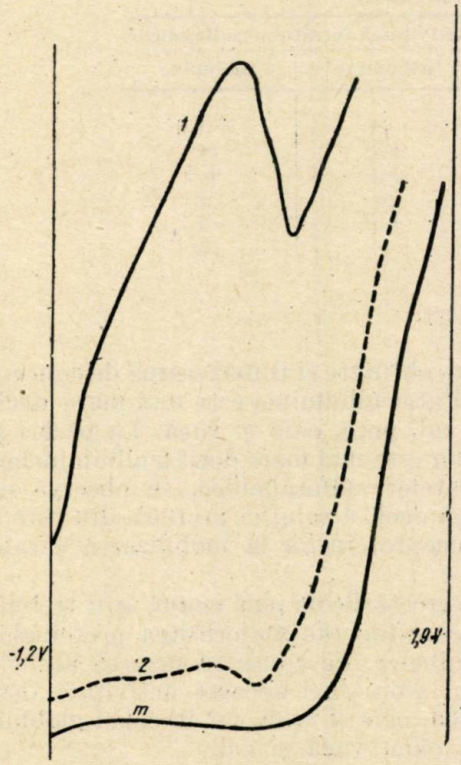


Fig. 2. — *Polarograma globulinelor de pasăre (găină).* Conc. în proteină : 22 mg% ; *m* = martor ;
1 = sol. globuline ; *2* = filtratul sulfosalicilic.



←Fig. 3. — *Polarograma albuminei de porc.* Conc. în proteină : 50 mg% ; *m* = martor ;
1 = sol. albumină ; *2* = filtrat sulfosalicilic.

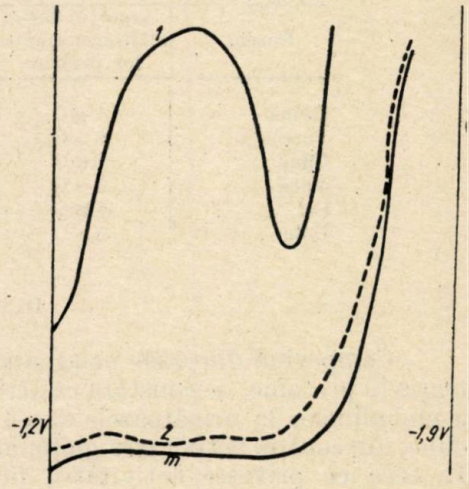


Fig. 4. — *Polarograma globulinei de porc.* Conc. în proteină : 50 mg% ; *m* = martor ;
1 = sol. globuline ; *2* = filtrat sulfosalicilic.

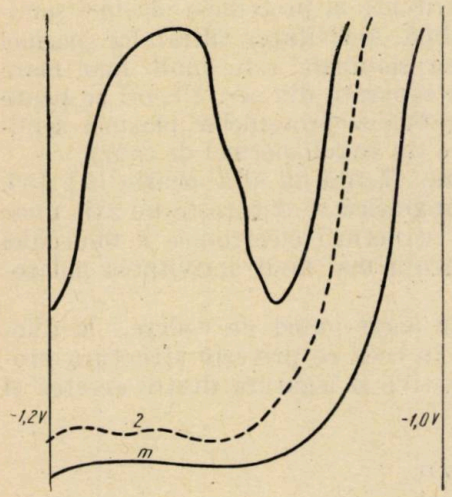


Fig. 5. — *Polarograma albuminei de cline.* Conc. în proteine : 47,7 mg% ; *m* = martor ; *1* = sol. albumină ; *2* = filtrat sulfosalicilic.

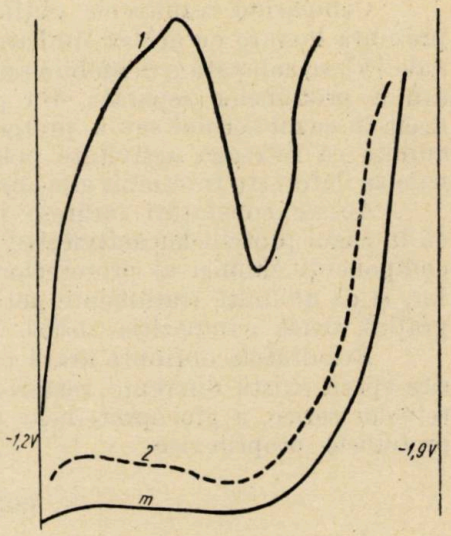


Fig. 6. — *Polarograma globulinei de cline.* Conc. în proteine : 35,6 mg% ; *m* = martor ; *1* = sol. globuline ; *2* = filtrat sulfosalicilic.

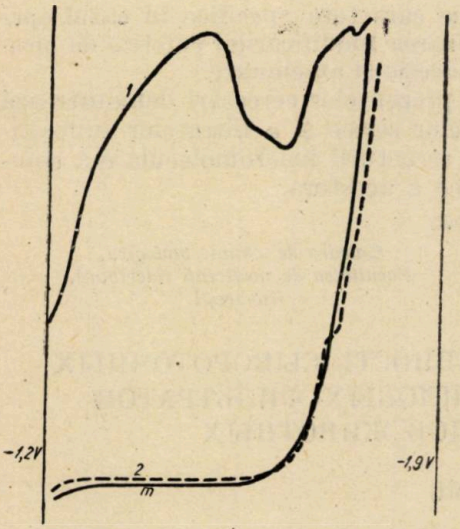


Fig. 7. — *Polarograma albuminei de vacă.* Conc. în proteine : 55 mg% ; *m* = martor ; *1* = sol. albumină ; *2* = filtrat sulfosalicilic.

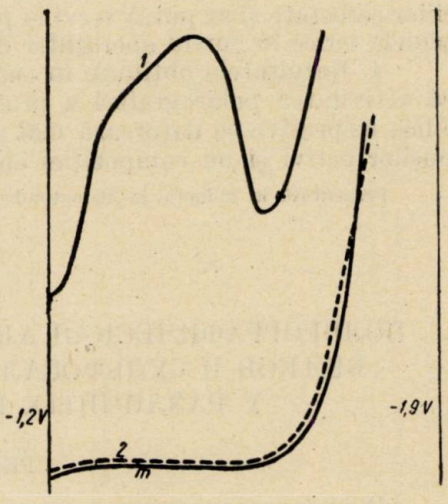


Fig. 8. — *Polarograma globulinelor de vacă.* Conc. în proteine : 131 mg% : *m* = martor ; *1* = sol. globuline ; *2* = filtrat sulfosalicilic.

Comparînd rezultatele obţinute cu ocazia cercetărilor descrise în prezenta lucrare cu acelea similare referitoare la proteinele plasmei seminale [5], se constată o deosebire apreciabilă. Activitatea filtratelor spermei sau a proteinelor separate din plasma seminală este mult mai mare decît în cazul serului sau a proteinelor separate din ser. Uneori se poate admite că întreaga activitate polarografică a proteinelor plasmei seminale se datoreşte fracţiunii glucoproteice (în cazul spermei de taur).

Aceste constatări întăresc ipoteza, făcută cu altă ocazie [6], [5], că în cazul proteinelor activitatea polarografică se datoreşte nu atît unor componenţi chimici ai proteinelor, cît structurii electronice a moleculei lor, şi că anumite tratamente pot influenţa mai mult activitatea polarografică decît compoziţia însăşi.

Rezultatele obţinute arată că, din acest punct de vedere, la diferite specii există diferenţe remarcabile în ceea ce priveşte structura proteinelor serice, a glucoproteinelor respective şi legătura dintre acestea şi proteinele propriu-zise.

CONCLUZII

1. Activitatea polarografică a celor două categorii principale de proteine serice variază cu specia. La cal, porc, oaie şi vacă activitatea albuminei este mai mare decît a globulinelor, iar la găină şi cîine activitatea globulinelor o întrece pe aceea a albuminei.

2. Deşi glucoproteinele sînt de obicei asociate cu fracţiunea globulinelor din ser, se constată, la unele specii, că activitatea polarografică a filtratelor sulfosalicilice este mai mare în cazul albuminei decît în cazul globulinelor (la porc, cîine şi cal).

3. Aceste particularităţi constituie caractere specifice în cazul speciilor cercetate şi ar putea servi la precizarea modificărilor suferite de proteinele serice în cursul operaţiilor de selecţie şi ameliorare.

4. Rezultatele obţinute în cursul prezentelor cercetări demonstrează că activitatea polarografică a proteinelor serice şi a filtratelor sulfosalicilice respective se datorează mai ales structurii macromoleculare a compuşilor activi şi nu compoziţiei chimice a acestora.

Prezentată la redacţie la 26 octombrie 1962

Catedra de chimie biologică,
Facultatea de medicină veterinară,
Bucureşti

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ И СУЛЬФОСАЛИЦИЛОВЫХ ФИЛЬТРАТОВ У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

РЕЗЮМЕ

В работе исследуется полярографическая активность некоторых категорий сывороточных белков и соответствующих сульфосалициловых фильтратов у некоторых видов животных. Было констатиро-

вано, что у лошади, свиньи, овцы и коровы полярографическая активность альбумина больше активности глобулинов.

У птиц (кур) и собак, наоборот, активность глобулинов больше активности альбумина. Что касается активности сульфосалициловых фильтратов, которую обычно относят за счет глюкопротеинов, было установлено, что она появляется для некоторых видов и в случае альбумина. Иногда, полярографическая активность фильтратов отсутствует даже в случае глобулинов (корова).

Указанные выводы могут служить для уточнения как некоторых специфических особенностей сывороточных белков, так и изменений, имеющих место под влиянием некоторых факторов.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — *Полярограмма альбумина птиц (кур)*. Концентрация белков: 22 мг %; *m* — контроль, полярограмма основного раствора; *1* — раствор альбумина; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 2. — *Полярограмма глобулина птиц (кур)*. Концентрация белков: 22 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор глобулинов; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 3. — *Полярограмма альбумина свиньи*. Концентрация белков: 50 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор альбумина; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 4. — *Полярограмма глобулина свиньи*. Концентрация белков: 50 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор глобулинов; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 5. — *Полярограмма альбумина собаки*. Концентрация белков: 47,7 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор альбумина; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 6. — *Полярограмма глобулина собаки*. Концентрация белков: 33,6 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор глобулинов; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 7. — *Полярограмма альбумина коровы*. Концентрация белков: 55 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор альбумина; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

Рис. 8. — *Полярограмма глобулина коровы*. Концентрация белков: 131 мг %; *m* — контроль; *1* — раствор глобулинов; *2* — сульфосалициловый фильтрат.

ACTIVITÉ POLAROGRAPHIQUE DES PROTÉINES SÉRIQUES ET DES FILTRATS SULFOSALICYLIQUES CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES

RÉSUMÉ

On a étudié l'activité polarographique de certaines catégories de protéines sériques et des respectifs filtrats sulfosalicyliques chez quelques espèces d'animaux. On constate que chez le cheval, le porc, le mouton et les bovidés, l'activité polarographique de l'albumine est plus grande que celle des globulines.

Par contre chez les oiseaux (poules) et le chien, l'activité des globulines dépasse celle de l'albumine. Quant à l'activité des filtrats sulfosalicyliques, habituellement attribuée aux glucoprotéines, on constate que chez certaines espèces elle apparaît aussi dans le cas de l'albumine. Quel-

quefois l'activité polarographique des filtrats est absente même dans le cas des globulines (bœuf).

Ces constatations peuvent servir à préciser quelques caractères spécifiques de certaines protéines sériques ainsi que les modifications qui se produisent sous l'influence de certains facteurs.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — *Polarogramme de l'albumine d'oiseau (poule).* Teneur en protéines : 22 mg%, *m* = témoin, polarogramme de la solution-support ; *1*=solution d'albumine ; *2*=filtrat sulfosalicylique.

Fig. 2. — *Polarogramme des globulines d'oiseau (poule).* Teneur en protéines : 22 mg% ; *m* = témoin, ; *1* = solution de globulines ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

Fig. 3. — *Polarogramme de l'albumine de porc.* Teneur en protéines : 50 mg% ; *m* = = témoin ; *1* — solution d'albumine ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

Fig. 4. — *Polarogramme des globulines de porc.* Teneur en protéines : 50 mg% ; *m* = = témoin ; *1* = solution de globulines ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

Fig. 5. — *Polarogramme de l'albumine de chien.* Teneur en protéines : 47,7 mg% ; *m* = = témoin ; *1* = solution d'albumine ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

Fig. 6. — *Polarogramme des globulines de chien.* Teneur en protéines : 35,6 mg% ; *m* = = témoin ; *1* = solution de globulines ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

Fig. 7. — *Polarogramme de l'albumine de bovidé.* Teneur en protéines : 55 mg% ; *m* = = témoin ; *1* = solution d'albumine ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

Fig. 8. — *Polarogramme des globulines de bovidé.* Teneur en protéines : 131 mg% ; *m* = témoin ; *1* = solution de globulines ; *2* = filtrat sulfosalicylique.

BIBLIOGRAFIE

1. BALLE-HELAERS E., *Polaroactivité quantitative des protéides des milieux biologiques. Application au dosage des protéines et des séromucoïdes sériques,* în *Advances in Polarography,* vol. III, Londra Pergamon Press, 1960.
2. BALLE-HELAERS E., *Dosage polarographique des fractions d'électrophorése. Protides of the biological fluides,* în *5-th Colloquim 1957,* Amsterdam, Edit. Elsevier, 1958.
3. BUCHNER M., *Die polarographische Serumfiltrat-Reaktion in der serochemichen Diagnostik,* Acta biol. med. germ. **5**, *5*, 423 (1960).
4. BURUIANĂ L. M., PAVLU V., *Efectul radiaţiilor asupra proteinelor. Influenţa razelor gamma asupra proteinelor din cristalin,* Studii şi cercetări de biochimie, **V**, 3 (1962).
5. BURUIANĂ L. M., HADARAG EL., PAVLU V., *Cercetări cu privire la proteinele din plasma seminală,* Studii şi cercetări de biochimie, **V**, *4*, 507 (1962).
6. BURUIANĂ L. M., PAVLU V., *Aplicaţiile metodei polarografice în studiul proteinelor,* Ses. ştiinţ. Inst. de med. veter., 24—26 septembrie 1962, Cluj (sub tipar).
7. KALOUS V., *A contribution to the study of substances giving Brdicka's polarographic filtrate reaction,* în *Advances in polarography,* Proc. of. the second Internat. Congress, 1959, vol. 3, Londra, Edit. Pergamon Press, 1960, p. 1067.
8. NGUEN THRONG THU, ARDY R., *Sur la dénaturation des proteines plasmatiques par le formaldehyde, observée au niveau des glycoprotéines,* Bull. Soc. Chim. Biol., **43**, *1*, 75 (1961).
9. WALDSCHMIDT-LEITZ E., *Über diagnostische verwertbare Veränderungen im Serum bei Krebs,* Z. Angew. Chem., **51**, *22*, 324 (1938).

CERCETĂRI ASUPRA PIERDERII DE AZOT PRIN TRANSPIRAȚIE

DE

IANCU GONȚEA și P. ȘUȚESCU

Prezența substanțelor azotate în sudoare a fost pusă în evidență din secolul trecut și cercetările ulterioare au arătat că prin transpirație se elimină uree, amoniac, acid uric, creatinină și aminoacizi. Aceste substanțe formează cea mai mare parte din materia organică conținută în produsul de secreție al glandelor sudoripare. Începînd din 1890, s-au efectuat numeroase studii asupra *concentrației azotului total din sudoare* (tabela 1), însă rezultatele obținute variază de la un autor la altul în limite foarte largi (0,16 și 3,30 g la litru), mai ales din cauza deosebirilor în metoda de cercetare. Transpirația s-a provocat prin efort fizic sau prin expunere la temperaturi ridicate (35—50°C), iar concentrația azotului s-a aflat fie direct, dozînd acest element în probele de sudoare recoltate prin diverse procedee, fie indirect, determinînd cantitatea eliminată (în lingeria folosită în timpul transpirației și în reziduurile de spălare a corpului) și raportînd valoarea găsită la volumul de sudoare, stabilit prin studiul bilanțului hidric pentru același interval de timp.

Admițînd că, dacă transpirația este intensă și umiditatea aerului depășește 75—80%, concentrarea prin evaporare este minimă, unii cercetători au strîns picăturile de sudoare direct în recipient (pahar, eprubetă) sau în pachețele de vată sau de tifon, acoperite uneori cu membrane impermeabile. Alți cercetători, pentru a reduce evaporarea la minimum, au introdus corpul pînă la gît sau numai părți din membre în spații restrînse (dulapuri sau băi speciale, etuve, între pături sau în costume cauciucate, pungi sau mănuși impermeabile, cilindri de sticlă închiși ermetic în jurul membrelor etc.). În aceste condiții se împiedică evaporarea, însă dacă timpul de recoltare se prelungește, sudoarea se concentrează prin reabsorbția apei [1], [4], [10]. Apoi, în unele cercetări s-a analizat sudoarea adunată la un loc de pe tot corpul, iar în altele numai eșantioane recoltate de pe părțile distale ale membrelor, fără a se ține seama de eventualele

Tabela nr. 1

Concentrația azotului total din sudoare (după diverși autori)

Autorii (cronologic)	Condiția de transpirație	Modul de recoltare a probelor	Numărul de		Azot-total (g la litru)
			subiecți	analize	
Argutinski (1890)	Baie de abur	Direct în recipient	1	2	0,77—1,100
Camerer (1901)	Baie de aer cald	Tăvi și vată hidrofilă	1	4	0,91—1,88
Schwenkenbecher și Spitta (1907)	Căldură (27—36°C) U.R. = 43—58%	Lingerie și bilanț ponderal	3	12	0,60—2,90 (1,35)
Kittsteiner (1913)	Căldură (40°C) U.R. = 60%	Cilindri sticlă și saci cauciucați (mîna+antebraț)	1	60	0,40—3,30 (0,50)
Durig, Neuberg și Zuntz (1916)	Efort (marș pe pod rulant; ascensiune)	Lingerie + reziduuri Bilanț	4	6	0,30—1,28 (0,72)
Barney (1925)	Căldură și pilocarpină	Între pături cauciucate (1 1/2 ore)	14	14	0,28—2,00 (0,76)
Talbert, Silvers și Johnson (1927)	Căldură (vara)	Saci cauciucați	18	79	0,34—1,63 (0,80)
Borchard (1931)	Baie de aburi (33°C și 90% U.R.)	În vană (90—180 min)	5	10	0,42—1,67 0,82
Chatron (1933)	Etuvă termală (5—10 min+ repaus 25 min)	Direct în recipient	2	2	0,37—0,43
Mosher (1933)	Cameră sudație (4050° C) 30—50 min	Între pînze cauciucate	3 (2 zile)	18	0,66—1,08 (0,82)
Voit (1933)	Baie aer cald (20—25 min)	Direct în recipient	13	13	0,60—1,22 (0,97)
Thiodet și Ribère (1936)	Căldură (45—50°C)	Sac cauciucat (40 min)	1	1	1,96
Daly și Dill (1937)	Efort la 28°C și U = 78%	Direct în recipient și mănuși cauciuc	3 4 săpt.	—	0,16—1,71
Dill, Hall și Edwards (1938)	Efort la cald	Reziduuri și bilanț	7	—	0,26—0,51 (0,33)
Mezincescu (1938)	Căldură (36—41°C) U = 80%	Total între pînze cauciucate (1—2 ore)	7	53	0,21—0,76 (0,32)
Moreira și colab. (1945)	Efort la 33°C și U = 80 %	Mănuși cauciuc pînă la cot	2	6	0,24—0,36
Gonțea, Șuțescu și Jantea (1959)	Efort la 35±2C°	Manșoane de polietilenă	63	449	0,22—0,76 (0,43)

variații regionale, determinate de repartiția inegală a glandelor sudoripare.

Metoda aflării concentrației azotului din sudoare, prin raportarea cantităților găsite în reziduuri la volumul de apă pierdută prin transpirație, are avantajul că rezultatele obținute nu sînt influențate de evaporare, însă prezintă inconvenientul că este foarte greoaie și o parte din materialul azotat se pierde cu sudoarea, care trece în vestmintele periferice sau cade sub formă de picături, mai ales în cursul operațiilor de spălare a corpului și de extragere a reziduurilor din lingerie. Apoi, valorile aflate prin acest procedeu cuprind nu numai substanțele azotate care au părăsit organismul prin glandele sudoripare, ci și pe cele aflate în sebum și în celulele desprinse de pe suprafața tegumentelor. Aceasta constituie un dezavantaj pentru cazul că se urmărește determinarea concentrației azotului din sudoarea pură, dar este un avantaj cînd se dorește aflarea pierderilor acestui element pe cale cutanată.

În ce privește cantitatea de azot pierdută la nivelul tegumentelor, deosebirile între rezultatele publicate de diverși autori sînt și mai mari (tabela 2). Dat fiind că pentru aflarea pierderilor, majoritatea autorilor au folosit metoda colectării tuturor produselor ce părăsesc organismul la suprafața tegumentară (picături de sudoare, apa de spălare a corpului și de extragere a substanțelor trecute în lingerie etc.), deosebirile de la o lucrare la alta nu se datoresc atît diversității procedeelor de recoltare (ca în cazul concentrației azotului din sudoare), ci mai ales modului diferit de exprimare a rezultatelor și condițiilor foarte variate în care s-au efectuat cercetările. Deși unul din factorii de variație individuală a mărimii acestor pierderi este întinderea suprafeței corporale, numai în 3 din 15 lucrări găsite în literatură cantitatea de azot pierdută a fost exprimată pe m^2. Întrucît de cele mai multe ori pierderea este dată pentru timpul cît a durat observația, spre a putea compara datele publicate de diverși autori a fost nevoie să le raportăm la o oră sau la 24 de ore. Însă, este de admis că, pe unitatea de timp și în aceleași condiții, o persoană cu o suprafață tegumentară de 2 m^2 pierde mai mult azot decît una cu 1,5 m^2.

Deși cunoașterea pierderilor cutanate se impune pentru efectuarea cu acuratețe a studiilor bazate pe determinarea bilanțului azotat, totuși nu s-a ținut seama de importanța lor. În cadrul cercetărilor pe care le-am întreprins, începînd din 1957, privind necesarul de proteine în cursul activității musculare la om prin metoda bilanțului [21] [22], pentru aflarea „eliminărilor" am socotit indispensabil să determinăm nu numai azotul din fecale și din urină, ci și pe cel pierdut la nivelul tegumentelor, ceea ce nu s-a făcut în nici una din lucrările anterioare în care s-a studiat influența efortului fizic asupra metabolismului azotat. Pentru aflarea pierderilor cutanate de azot, ar fi fost indicat să colectăm integral, atît sudoarea, cît și reziduurile de pe piele și din vestminte, însă dat fiind că cercetările noastre se efectuau pe oameni în activitate musculară, această metodă nu putea fi aplicată fără modificarea condițiilor de muncă și fără introducerea unui factor de variație ce ar fi îngreuiat interpretarea rezultatelor. *Admițînd că principala cale de eliminare a azotului la nivelul tegumentelor în cursul muncii fizice este transpirația* și avînd în vedere că volumul de apă elimi-

Tabela nr. 2

Pierderea de azot pe cale tegumentară (după diverşi autori)

Autorii (cronologic)	Condiţia de transpiraţie	Modul de recoltare a probelor	Numărul de		Pierderea de azot
			persoane	determinări	
Cramer (1890)	Repaus Plimbare Efort	Lingerie (8—24 ore)	1	—	0,17—1,01 g/24 ore (repaos la pat : 128 mg/24 ore) În o oră de plimbare vara = 90 mg iarna = 50 mg În o oră de efort: 235 mg(11 250 Kgm/oră)
Eijkman (1893)	Căldură (tropice)	Lingerie şi reziduuri 24 ore	3	3	1,0—1,5 g/24 ore
Zuntz şi Schumburg (1901)	Marş cu încărcătură	Lingerie + antrenarea reziduurilor	1	3	72—95 mg/oră
Benedict (1906)		Lingerie şi reziduuri	5	—	În cursul activităţii fizice pînă la 222 mg/oră
Schwenkenbecher şi Spitta (1907)	Căldură Obişnuit	Pături cauciucate Lingerie+reziduuri	3 5	12 8	55—120 mg/oră 0,38 g/24 ore
Berry (1916)	Efort cicloergometru (18—20°C)	Lingerie + reziduuri (3—4 ore)	1	10	70—162 mg/oră (114 mg/oră)
Bost şi Borgstrom (1926)	Efort la 30—32°C şi U = 62—71 %	În costume de bumbac + reziduuri	2 (136—180 min)	8	75 mg/m²/oră (în efort) 0,45 g/m²/24 ore
Barney (1936)	Căldură şi pilocarpină	Între pături cauciucate	17	17	51—249 mg/oră (131)
Cuthbertson şi Guthrie (1934)	Repaus la pat (15—20°C)	Lingerie+ antrenarea reziduurilor (48 ore)	12	19	0,22—0,44 g/24 ore (118—331 mg/m²/24 ore
Freyberg şi Grant (1937)	Perspiratio insensibilis	Lingerie + reziduuri în 24 de ore	2	4	0,18—0,23 g/24 ore
Mc Cance (1938)	Căldură radiantă (30°C)	Totală în baie (cîte 130 min)	9 bărbaţi 7 femei	16	318 mg/oră 175 mg/oră
Böttner şi Schlegel (1940)	Căldură (40°C)	În vane + reziduuri (2 ore)		6	51—216 mg/oră
Mitchell, Hamilton şi Haines (1949)	Cameră climatică (27—28°) şi U.R. =43—45; 37—39°, U.R. =65—73	În recipiente, lingerie şi reziduuri (7 1/2 ore)	6	—	15 mg/oră (2,7 % din pierderi) 152 mg/oră (22,5 % din pierderi)
Darke (1960)	În condiţii obişnuite	Lingerie şi antrenarea reziduurilor (24 ore)	12 (în spital)	14	254±22,9 mg/24 ore
Kraut şi Müller-Wecker (1960)	În condiţii obişnuite	Lingerie şi antrenarea reziduurilor (24 ore)	6 bărbaţi 7 femei (2—3 săpt.)	128 96	232±17,2 mg/m²/ 24 ore 105±11,8 mg/m²/24 ore

nată prin piele poate fi aflat relativ ușor (în orice formă de activitate musculară) prin studiul bilanțului ponderal, am căutat o tehnică adecvată de recoltare a sudorii și am dozat conținutul său în azot total, *urmărind să aflăm dacă se poate stabili o concentrație medie, care să permită evaluarea pierderilor cutanate numai prin determinarea volumului de sudoare, fără a recolta și analiza probe.* Numeroasele date strînse în cursul cercetărilor efectuate scot în evidență, atît factorii de variație a concentrației azotului din sudoare, cît și mărimea pierderilor pe această cale și repercuția lor asupra exactității cu care se stabilește bilanțul azotat, cînd se neglijează cantitatea eliminată prin glandele sudoripare. Întrucît nu există un studiu similar de amploarea acestuia, am socotit util să prezentăm o privire de ansamblu asupra materialului experimental de care dispunem.

METODA DE CERCETARE

Pentru recoltarea sudorii am căutat un procedeu, care pe de o parte să prevină concentrarea prin evaporare, pe de altă parte să nu jeneze desfășurarea normală a activității musculare și să influențeze cît mai puțin condițiile de termoliză. În acest scop s-au confecționat manșoane de polietilenă (10—20 cm lungime), prevăzute la capete cu cordoane elastice. Aplicînd cîte un asemenea manșon pe torace, brațe și coapse, timp de 20—30 de minute în cursul reprizelor de efort, s-au obținut, la adăpost de aer, eșantioane de cîte 10—15 ml sudoare din diferite părți ale corpului. Pentru a evita efectul unor eventuale reziduuri de pe tegumente și spre a obține o sudoare cît mai pură, înainte de aplicarea manșoanelor pielea era spălată, mai întîi cu apă și săpun , apoi cu apă distilată, și svîntată cu tifon sau cu un prosop curat. Determinarea azotului s-a făcut în sudoarea filtrată, prin metoda Kjeldahl, cu aparatul Parnas-Wagner.

Cercetările s-au efectuat pe 30 de bărbați sănătoși, în vîrstă de 21—28 de ani și în greutate de 60—77 kg, pentru o înălțime de 1,60—1,80 cm. Fiecare persoană a fost internată și hrănită în laborator, unde a rămas tot timpul observațiilor, a căror durată a variat între 28 și 52 de zile. Dieta, riguros controlată prin determinarea cantității de azot din fiecare aliment, a furnizat 1,0 sau 1,5 g proteine/kilocorp. Activitatea musculară s-a efectuat la cicloergometru, fiind alcătuită din 6—8 reprize a cîte 20—30 de minute de efort, separate prin pauze de cîte 30—40 de minute, durata medie pe ziua de lucru fiind de circa 8 ore. Intensitatea efortului a variat de la 400 la 1 200 kgm/minut, iar cantitatea de travaliu exterior produs a fost cuprinsă între 70 000 și 130 000 kgm/zi. O perioadă de activitate musculară a durat de la 4 la 20 zile și aceeași perioadă s-a repetat în condiții diferite de microclimat sau de aport proteic.

Volumul de sudoare s-a aflat prin studiul bilanțului ponderal. Subiectul dezbrăcat era cîntărit înainte și la sfîrșitul zilei de lucru și uneori după cîte două reprize de efort. În acest interval s-au măsurat atît „aportul" (A), reprezentat prin apă, alimente și oxigen, cît și „eliminările" (E), alcătuite din urină, fecale și bioxid de carbon, și s-au analizat schimburile respiratorii (metoda Douglas-Haldane), notînd umiditatea aerului inspirat. Ținînd seama de ceea ce a intrat și a ieșit din corp, prin aflarea diferenței dintre greutatea inițială (G_1) și cea finală (G_2) s-a obținut apa eliminată extrarenal. Cunoscînd ventilația pulmonară și umiditatea aerului înspirat, s-a aflat apa pierdută pe cale respiratorie, care scăzînd-o din apa extrarenală s-a obținut cantitatea de sudoare.

Apa extrarenală $= G_1 + (A - E) - G_2$

Sudoarea (grame) = apa extrarenală — apa respiratorie

Pentru aflarea azotului pierdut prin transpirație s-a înmulțit cantitatea de sudoare cu valoarea medie a conținutului său în acest element, stabilit prin analiza mai multor probe recoltate în același interval de timp de pe diferite părți ale corpului.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

De la 30 de bărbați internați și alimentați în laborator cîte 28—52 de zile, pentru cercetări asupra nevoii de proteine în cursul activității musculare, s-au recoltat și analizat peste 1 000 de probe de sudoare, însă *pentru această lucrare s-au folosit numai datele necesare pentru a pune în evidență* : *a*) factorii de variație a *conținutului său în azot și b*) *importanța pierderilor acestui element prin transpirație.*

A. Concentrația azotului total din sudoare

Conținutul în azot al sudorii recoltate de la aceeași persoană, prin același procedeu (mănșoane de polietilenă) și filtrată variază în funcție de mai mulți factori.

1. *Variații topografice.* Dată fiind repartiția inegală a glandelor sudoripare pe suprafața corpului, în primul rînd am studiat influența regiunii. În acest scop s-au prelucrat statistic valorile găsite în sudoarea recoltată concomitent, dar separat, de pe torace, brațe și coapse, de la 12 persoane, în aceeași perioadă și repriză de activitate musculară, efectuată în condiții similare de alimentație (1 g proteine pe kilocorp) și de microclimat (20 ± 2°C). Din rezultatele obținute, consemnate în tabela nr. 3, reiese că nivelul concentrației azotului din sudoarea de pe brațe este cu 18% și în cea de pe coapse cu 35% mai mare decît în sudoarea de pe torace, iar prelucrarea statistică arată că deosebirile sînt reale ($p < 0{,}05$).

Tabela nr. 3

Concentrația azotului total din sudoare în funcție de regiunea topografică

Date	Torace	Brațe	Coapse
Numărul persoanelor	12	12	12
Numărul probelor	72	72	72
Concentrația medie (g la litru)	0,416 ± 0,020	0,492 ± 0,028	0,564 ± 0,043

Semnificația diferențelor între torace și brațe : $p < 0{,}03$
„ „ coapse : $p < 0{,}003$

2. *Efectul prelungirii perioadei de activitate musculară și a timpului de transpirație.* Pentru a vedea influența acestui factor s-a comparat *concentrația în azot a sudorii recoltate de pe torace la trei intervale diferite din cursul aceleiași zile de lucru* (I, a III-a și a VI-a repriză de efort), de

la persoane ce au executat aceeași activitate musculară, în condiții similare de temperatură (20±2°C) și de alimentație (1 g proteine pe kilocorp). Prelucrînd datele pentru 18 persoane, în cîte 4 zile de lucru fiecare (în total 64 de zile), s-au obținut rezultatele prezentate în tabela nr. 4, care arată că *pe măsură ce activitatea musculară și timpul de transpirație se prelungesc, concentrația azotului din sudoare scade și diferențele sînt semnificative* ($p < 0,05$). Însă, dat fiind că în unele cazuri volumul de sudoare eliminat pe oră a crescut în cursul zilei de lucru (în a VI-a repriză de efort fiind ceva mai mare decît în prima), este posibil ca cel puțin în parte efectul să fie realizat prin acest mecanism.

Tabela nr. 4

Repercutarea prelungirii timpului de transpirație asupra concentrației azotului total din sudoare

Date	Repriza de efort		
	I	III	VI
Numărul persoanelor	18	18	18
Numărul probelor	192	192	192
Concentrația medie (g la litru)	0,479 ± 0,020	0,429±0,028	0,399±0,043

Semnificația diferențelor între I și III $p<0,05$
„ I și VI $p<0,003$

3. *Influența intensității transpirației.* Spre a vedea intervenția acestui factor s-a studiat concentrația azotului din sudoarea recoltată de pe torace, de la aceeași persoană, în funcție de mărimea debitului sudoral pe unitatea de timp. Urmărind efectul intensității efortului și al microclimatului cald asupra nevoii de proteine [21], am avut prilejul să strîngem date care arată cum variază concentrația azotului cînd volumul de sudoare eliminată pe oră a crescut de 2—6 ori. Prin prelucrarea valorilor obținute în cercetări efectuate pe 10 persoane, în cîte 2 perioade a 4 zile de activitate musculară, executată în două condiții diferite de microclimat, s-au obținut rezultatele trecute în tabela nr. 5. Din aceste date reiese că *proporția de azot scade pe măsură ce transpirația se intensifică, însă diferența devine statistic semnificativă* ($p < 0,05$) *numai cînd volumul de sudoare depășește 400 g/oră, iar de la un anumit nivel de creștere a volumului (peste 600 g/oră) concentrația medie a azotului din sudoare a încetat de a mai scădea.*

4. *Efectul adaptării (antrenament și aclimatizare).* Posibilitatea intervenției acestui factor în concentrația azotului din sudoare a fost examinată prin prelucrarea statistică a datelor obținute în cercetările efectuate la temperatura laboratorului (20±2°C) pe 8 persoane, supuse la același regim, ce furniza 1 g proteine pe kilocorp, în scopul de a vedea influența adaptării la efort asupra metabolismului azotat (21). Studiind variațiile în concentrația azotului total din sudoarea recoltată de pe torace timp de 20 de zile (320 de determinări) și calculînd valorile medii zilnice și pe perioade de cîte 4 zile, am constatat că *în timpul antrenamentului nu s-au produs modificări semnificative* (tabela nr. 6). Însă prin adaptare la

Tabela nr. 5

Concentrația azotului din sudoare în funcție de intensitatea transpirației

Volumul de sudoare (g/oră)	Temperatura din încăpere	Concentrația azotului (g/litru)
Între 100 și 200	20 ± 2°C	0,469 (0,320 — 0,757)
Între 201 și 300		0,451 (0,308 — 0,655)
Între 301 și 400		0,435 (0,293 — 0,596)
Între 401 și 500	35 ± 2°C	0,362 (0,259 — 0,529)
Între 501 și 600		0,334 (0,220 — 0,489)
Între 601 și 800		0,338 (0,245 — 0,516)
256	20 ± 2°C	0,451 ± 0,026 $p < 0,02$
467	35 ± 2°C	0,363 ± 0,016

efort fizic, cheltuiala de energie pentru efectuarea aceluiași travaliu exterior s-a redus, transpirația a devenit mai puțin intensă, și în felul acesta pierderea de azot cu sudoarea eliminată în cursul zilei de lucru (8 ore) a scăzut (vezi punctul *B*).

Tabela nr. 6

Concentrația azotului neproteic din sudoare în cursul antrenamentului

Date	Zilele de efort (la 20 ± 2°C)		
	I — IV	IX—XII	XVII—XX
Numărul persoanelor	8	8	8
Numărul probelor	64	64	64
Concentrația medie (g/litru)	0,480 ± 0,027	0,515 ± 0,044	0,506 ± 0,034

Din prima zi de activitate musculară efectuată la cald (35 ± 2°C), transpirația fiind mult mai intensă, concentrația azotului din sudoare a fost mai redusă decît la temperatura obișnuită (20 ± 2°C), însă ea nu s-a modificat în următoarele 3 zile. Semnalăm, că, după unii cercetători [15] [35], expunerea repetată la căldură (aclimatizarea) nu influențează concentrația azotului în sudoare, ci numai conținutul său în substanțe minerale (NaCl), însă alții [4] [27] au observat o scădere, fără a preciza dacă aceasta se datorește intensificării transpirației sau este unul din efectele procesului de aclimatizare.

5. *Repercuția mărimii aportului de proteine.* Pentru a vedea efectul acestui factor s-au comparat valorile obținute la analiza sudorii de pe torace, în cercetări făcute pe 8 bărbați (22), în care s-a urmărit influența aceleiași activități musculare, executate în aceleași condiții de temperatură (20 ± 2°C), însă într-o perioadă dieta furniza 1 g proteine pe kilocorp și în altă perioadă 1, 5 g. Din rezultatele consemnate în tabela nr. 7 *reiese că după majorarea rației de proteine de la 65—75 la 105—115 g pe zi concentrația azotului din sudoare a crescut în medie cu 18,5%*, iar prelucrarea

statistică arată că *diferența dintre medii este semnificativă* ($p < 0,01$), ceea ce confirmă datele semnalate de alți cercetători [14] [28] [33].

Tabela nr. 7

Influența mărimii aportului de proteine asupra concentrației azotului total din sudoare

Date	Rația de proteine	
	1 g/kilo/corp	1,5 g/kilo/corp
Numărul persoanelor	8	8
Numărul probelor	80	80
Concentrația medie (g la litru)	0,428 ± 0,019	0,507 ± 0,025
Semnificația diferenței	$p < 0,01$	

6. *Deosebiri individuale.* Spre a sesiza importanța factorului individual s-a comparat cantitatea de azot total din sudoarea recoltată de pe torace, în aceleași condiții de alimentație (1 g proteine pe kilocorp zilnic) și de microclimat (20 ± 2°C) și în aceeași perioadă și repriză de activitate musculară. Rezultatele, expuse în tabela nr. 8, arată că limitele variațiilor de la un individ la altul sînt mult mai restrînse decît cele publicate de diverși autori.

În condiții identice, concentrația azotului total din sudoarea recoltată de la același individ în 8—12 zile diferite a variat puțin, iar 75% din valorile găsite la 30 de bărbați au fost cuprinse între 0,35 și 0,55 g la litru. Cantitățile mai mari de 0,8 $g^0/_{00}$, publicate de unii autori, nu pot fi înțelese decît admițînd concentrarea sudorii prin evaporarea sau reabsorbția apei, iar cele mai mici de 0,2 $g^0/_{00}$, aflate prin dozarea azotului în reziduurile spălate de pe tegumente sau extrase din costume (lingerie), se datoresc probabil pierderii unei părți din sudoare sau din materialul azotat.

Tabela nr. 8

Limitele de variație ale cantității de azot total din sudoarea filtrată (în g/litru)

Număr de persoane	Număr de probe	Minimul	Maximul	Media	Deviația standard
30	336	0,220	0,757	0,450	±0,012

7. *Concentrația medie globală.* Pentru a vedea dacă se poate stabili o concentrație medie globală, trebuie făcută o privire de ansamblu asupra efectului exercitat de factorii studiați (tabela nr. 9). Dacă se ia ca termen de referință valoarea de 0,450 ± 0,012 g la litru, care reprezintă media din 336 de probe recoltate în 8—12 zile diferite, de pe torace, de la 30 de persoane în activitate musculară, se constată că majoritatea mediilor corespunzătoare celorlalți factori de variație se situează în jurul acestei valori. Numai mediile ce caracterizează sudoarea de pe coapse și transpirația intensă (cu peste 400 ml/oră) se deosebesc semnificativ de 0,45 g la litru.

Avînd în vedere proporția pe care o reprezintă coapsele în suprafața de transpirație, *se poate admite că 0,45 g la litru oglindesc destul de fidel*

concentrația medie globală a azotului neproteic din sudoarea bărbaților ce desfășoară o activitate musculară intensă, în condiții de mediu confortabil. Pentru cazul cînd efortul fizic se execută în căldură și transpirația este profuză, valoarea de 0,45 g la litru nu corespunde realității. În aceste condiții, pentru aflarea pierderii de azot numai prin determinarea cantității de sudoare este indicată folosirea unei concentrații medii globale de 0,36 g la litru.

Tabela nr. 9

Efectul factorilor de variație asupra valorii medii a concentrației azotului total din sudoarea filtrată

Factorul de variație	Concentrația medie		(g/litru)
Regiunea	Torace 0,416	Brațe 0,492	Coapse 0,564
Intervalul din cursul unei zile de lucru (8 ore)	În etapa inițială 0,479	La mijloc 0,429	În etapa finală 0,399
Intensitatea transpirației în cursul activității musculare	La 20 ± 2°C (pînă la 400 g/oră) 0,451		La 35 ± 2°C (peste 400 g/oră) 0,363
Adaptarea (antrenament, aclimatizare)	Fără efect semnificativ		
Rația de proteine	1 g/kilo/corp (65—75 g pe zi) 0,428		1,5 g/kilo/corp (105—115 g pe zi) 0,507

Sudoarea de pe membre fiind mai bogată în azot decît cea de pe trunchi, evaluarea pierderilor în acest element prin înmulțirea debitului sudoral cu concentrația găsită în probele recoltate de pe mîini și antebrațe (în mănuși de cauciuc) este mai puțin precisă decît folosirea uneia din valorile medii globale. Dacă se dorește o precizie mai mare, se poate atenua efectul unor factori de variație a concentrației, dozînd azotul total din 1—2 probe de sudoare, corect recoltate de pe trunchi.

B. Mărimea pierderilor de azot prin transpirație

Azotul pierdut prin transpirație s-a determinat, pentru fiecare zi de lucru, înmulțind cantitatea de sudoare eliminată în timpul activității musculare (circa 8 ore), cu valoarea medie a conținutului său în acest element, stabilită prin analiza mai multor probe recoltate de pe diferitele părți ale corpului, în același interval de timp. Întrucît durata zilei de lucru nu a fost aceeași (între $7^1/_2$ și $8^1/_2$ ore) și corpolența persoanelor în observație a fost diferită, pentru a sesiza intervenția factorilor de variație și

a obține rezultate comparabile și cu aplicabilitate mai generală, am raportat datele aflate atît la ora de lucru, cît și la m² și oră*). În același scop, prelucrarea statistică a materialului disponibil s-a făcut pe grupe de persoane care au efectuat activitatea musculară în aceleași condiții de temperatură și de alimentație. Rezultatele astfel obținute sînt expuse în tabela nr. 10.

Tabela nr. 10

Pierderea de azot prin transpirație în cursul activității musculare și efectul principalilor factori de variație

Condiția de cercetare		Numărul		Mg azot-total pierdut	
Temperatura	Aport proteic g	persoanelor	zilelor	oră	m² și oră
		a) Variații individuale			
20 ± 2°C	65—75	30	97	108 ± 3,5 (72 — 178)	60 ± 1,64 (43 — 106)
		b) Temperatura			
20 ± 2°C	65—75	12	12	122 ± 8,38	68 ± 4,46
35 ± 2°C	65—75	12	12	178 ± 11,29	98 ± 5,86
				$p<0,001$	$p<0,001$
		c) Rația de proteine			
20 ± 2°C	65—75	8	37	116 ± 5,36	62 ± 2,83
20 ± 2°C	105—115	8	29	138 ± 9,82	74 ± 4,47
				$p = 0,05$	$p < 0,05$
		d) Antrenamentul			
20 ± 2°C	65—75				
Ziua I—IV		8	8	123 ± 4,6	69 ± 3,5
„ XVII—XX		8	8	95 ± 10,4	54 ± 5,9
				$p<0,05$	$p<0,05$

La 30 de bărbați, tineri pierderea medie de azot prin transpirație în cursul perioadei de activitate musculară a variat, de la o persoană la alta, între 72 și 178 mg/oră (43—106 mg/m²/oră). La cald (35 ± 2°C), după cum s-a arătat mai sus (partea *A*), concentrația azotului a scăzut semnificativ, însă această scădere nu a compensat total creșterea debitului sudoral, iar pierderea de azot prin transpirație a fost cu 45% mai mare decît la temperatura obișnuită (20 ± 2°C). Ridicarea rației de proteine, de la 65—75 la 105—115 g pe zi, a mărit cu aproape 20% concentrația de azot eliminat cu sudoarea, cu toate că volumul acesteia nu a crescut semnificativ. Prin antrenament, scăzînd cheltuiala de energie pentru unitatea de travaliu exterior produs și transpirația devenind mai puțin intensă, pierderea de azot pe această cale s-a redus în medie cu 22%.

*) Pentru aflarea suprafeței corporale, s-a folosit formula lui Dubois

$$\text{Log } S = (0,425\ G + 0,725 \log I) + 1,8564$$

în care, S = suprafața (cm²), G = greutatea (kg) și I = înălțimea (cm).

Deși în cele 16 ore din restul zilei persoanele în observație nu au mai desfășurat o activitate musculară și, trăind în microclimat confortabil, nu au mai transpirat aparent, totuși este sigur că dacă studiul ar fi cuprins 24 de ore, cantitatea de azot pierdut prin transpirație ar fi fost mai mare. Folosind pentru estimarea pierderilor din acest interval valoarea de 10—15 mg pe oră, găsită în cercetările efectuate pe subiecți în repaus la temperatură convenabilă (tabela nr. 2), cantitatea medie de azot eliminat prin transpirație se apropie de 1 g în 24 de ore pentru persoanele care au desfășurat activitatea în condiții favorabile și depășește mult acest nivel pentru cele care au lucrat la cald. Semnalăm că, după unii cercetători [25], [26], la femei pierderea de azot pe cale cutanată este mai redusă decît la bărbați.

Importanța pierderilor de azot prin transpirație poate fi apreciată prin raportarea lor la totalul eliminărilor. Procedînd în felul acesta, cantitatea de azot pierdută cu sudoarea în cursul celor 8 ore de lucru reprezintă numai 6% în condiții de microclimat favorabil și circa 8% cînd efortul s-a executat la cald. Dat fiind însă că azotul eliminat prin rinichi și intestin s-a determinat în 24 de ore, pe cînd acela din sudoare numai în 8 ore, pentru a vedea măsura în care participă transpirația la eliminarea produșilor de metabolism protidic în cursul activității musculare, am comparat pierderea sudorală de azot neproteic cu excreția prin rinichi (ambele calculate pe m^2 și oră), la persoane care au efectuat activitate musculară în aceleași condiții de microclimat și de alimentație. Valorile medii al rezultatelor obținute sînt prezentate în tabela nr. 11.

Astfel exprimată, cantitatea de azot pierdut cu sudoarea reprezintă, în medie, 22% din totalul eliminărilor pe cale renală și prin transpirație. Cînd activitatea musculară s-a petrecut la cald, proporția pierderilor sudorale de azot s-a ridicat la 28%. În cazul dietei mai bogate în proteine azoturia crescînd, procentual pierderea de azot prin transpirație a fost ceva mai redusă.

Cunoscînd mărimea pierderilor de azot prin transpirație, spre a vedea în ce măsură nesocotirea lor afectează exactitatea unui bilanț în acest element, trebuie pornit de la faptul că în interpretarea rezultatului unei asemenea determinări este decisivă diferența dintre aport și eliminări (nu mărimea absolută a termenilor). În acest fel, pentru a sesiza just însemnătatea pierderilor de azot prin transpirație, acestea trebuie raportate la variația în plus sau minus a diferenței dintre aport și pierderi, ceea ce s-a făcut în tabela nr. 12, pentru cîteva cazuri.

Exemplele prezentate în acest tabel demonstrează că pierderea de azot prin transpirație poate reprezenta de la 23 pînă la 98% din valoarea bilanțului. Ea influențează nu numai mărimea ce se consideră reținută sau eliminată, ci și felul cum se interpretează sensul în care se desfășoară metabolismul protidic. Prin neglijarea pierderilor sudorale de azot, s-ar putea conchide că organismul reține acest element sau este în echilibru azotat, pe cînd în realitate bilanțul este negativ. Nesocotirea azotului pierdut prin transpirație micșorează considerabil valoarea științifică a lucrărilor referitoare la influența activității musculare asupra metabolismului azotat și explică divergențele dintre rezultatele obținute de diferiți autori.

Tabela nr. 11

Eliminarea de azot prin transpirație și pe cale renală în cursul activității musculare

Condiția de cercetare		Numărul		Pierderea de azot (mg/m²/oră)				
Temperatura	Aport proteic (g)	persoanelor	Zilelor	Totalul ($U+S$)	Urină (U)		Sudoare (S)	
					Absolut	%	Absolut	%
a) Variații individuale								
20 ± 2°C	65 — 75	30	97	294 ± 3,44	234 ± 2,56	80 ± 0,39	60 ± 1,64	20 ± 0,39
Limite de variație				237 — 362	197 — 273	71 — 88	43 — 106	15 — 33
b) Efectul temperaturii								
20 ± 2°C	65 — 75	9	9	300 ± 5,34	235 ± 3,98	78 ± 0,81	65 ± 3,23	22 ± 0,79
35 ± 2°C	65 — 75	9	9	339 ± 8,05	244 ± 4,18	72 ± 1,32	94 ± 5,85	28 ± 1,32
				$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
c) Efectul rației de proteine								
20 ± 2°C	65 — 75	8	38	307 ± 6,05	245 ± 4,68	79 ± 0,77	62 ± 3,04	21 ± 0,77
idem	105 — 115	8	29	416 ± 9,54	342 ± 6,52	83 ± 0,95	74 ± 4,80	17 ± 0,95
				$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

Tabela nr. 12

Repercutarea pierderilor de azot prin transpirație asupra bilanțului azotat din cursul activității musculare

Condiția de cercetare		Valoarea bilanțului g/24 ore		Participarea procentuală a azotului sudoral
Temperatura	Rația de proteine (g)	Fără azotul pierdut prin transpirație	Ținînd seama de azotul din sudoare	
La 20 ± 2°C	65—75	+0,395	—0,409	
		—0,051	—0,925	94
		—0,602	—1,903	68
		—0,579	—1,203	52
		—2,008	—3,144	36
		—2,117	—2,744	23
Idem	105—115	+2,281	+1,357	
		+1,454	+0,024	
		+0,711	—0,687	
		+0,018	—0,704	
		—0,018	—1,133	98
		—0,388	—1,104	64
35 ± 2°C	65—75	—0,326	—0,985	67
		—1,267	—2,440	48
		—1,228	—2,367	48
		—0,998	—1,783	44
		—2,099	—3,102	32

CONCLUZII

În cercetările asupra nevoii de proteine a omului prin metoda bilanțului, pentru aflarea eliminărilor s-a determinat cu regularitate atît azotul din fecale și urină, cît și cel din sudoare. Studiile s-au efectuat pe 30 de bărbați sănătoși (21—28 de ani, 60—77 kg și 160—180 cm), care au fost internați și alimentați în laborator, unde au rămas tot timpul observațiilor (28—52 de zile). Sudoarea s-a recoltat în timpul activității musculare (6—8 reprize a 20—30 de minute de efort la cicloergometru, separate prin pauze a cîte 30—40 de minute), în manșoane de polietilenă aplicate pe diferite părți ale corpului. Volumul de sudoare s-a aflat prin determinarea bilanțului, ținînd seama atît de aport și de eliminări, cît și de schimburile respiratorii și de umiditatea aerului inspirat. S-au analizat peste 1 000 de probe, recoltate în diferite condiții. Prelucrarea statistică a rezultatelor obținute a scos în evidență atît factorii de variație a concentrației azotului total neproteic din sudoare, cît și importanța pierderilor acestui element prin transpirație.

Dacă recoltarea sudorii se face de pe aceeași regiune și în aceleași condiții de temperatură și de alimentație, concentrația azotului variază de la un individ la altul între 0,22 și 0,76 g la litru, valoarea medie fiind de 0,45 ± 0,012 g la litru.

Sudoarea de pe membre conține cu 18—35% ($p < 0,03$) mai mult azot decît aceea recoltată concomitent de pe torace.

În cursul aceleași zile de lucru, pe măsură ce activitatea musculară și timpul de transpirație se prelungesc, concentrația azotului din sudoare scade ($p < 0,05$).

Cînd volumul de sudoare a crescut la peste 400 g/oră, conținutul său în azot s-a redus de la 0,451 ± 0,026 la 0,363 ± 0,016 $p < 0,02$).

Prin repetarea aceleiași activități musculare (antrenament), timp de 3 săptămîni la 20 ± 2°C, nu s-au produs modificări semnificative în concentrația azotului din sudoarea recoltată de pe torace.

Menținînd constante toate celelalte condiții (activitate musculară, microclimat etc.), după majorarea rației de proteine de la 65—75 la 105—115 g pe zi, conținutul sudorii în azot a crescut cu 18,5% ($p < 0,01$).

Pentru evaluarea pierderilor sudorale de azot din cursul activității musculare numai prin determinarea volumului de sudoare, fără a recolta și analiza probe, se poate folosi concentrația medie de 0,45 g la litru pentru mediul confortabil sau 0,36 g pentru mediul cald, cînd volumul de sudoare depășește 400 g pe oră.

La 20 ± 2°C, pierderea de azot prin transpirație în cursul activității musculare a variat, de la o persoană la alta, între 43 și 106 mg/m²/oră, valoarea medie fiind de 60 ± 1,64.

Cînd efortul s-a executat la 35 ± 2°C, cantitatea de azot pierdut cu sudoarea a crescut în medie cu 45% ($p < 0,001$).

În cursul activității musculare, pierderea sudorală de azot a reprezentat de la 22% (la 20 ± 2°C) pînă la 28% la (35 ± 2°C) din totalul eliminărilor pe cale renală și prin transpirație (ambele fiind raportate la m² și oră).

Cantitatea de azot pierdut prin transpirație poate reprezenta pînă la 98% din valoarea bilanțului (diferența între aport și eliminări) și ea influențează nu numai mărimea acestuia, ci și felul cum se interpretează sensul în care se desfășoară metabolismul protidic.

Neglijarea pierderilor sudorale de azot constituie una din principalele cauze ale divergenței dintre rezultatele cercetărilor, referitoare la influența activității musculare asupra metabolismului azotat.

Prezentată la redacție la 21 decembrie 1962

Catedra de alimentație
a Institutului medico-farmaceutic,
București

ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТЕРЬ АЗОТА ПУТЕМ ВЫПОТА

РЕЗЮМЕ

В исследованиях относительно потребности человека в белках балансным методом, для выяснения выделений, регулярно определяли азот в кале, моче и выпоте. Исследования проводились на 30 здо-

ровых мужчинах (возраста от 21 до 28 лет, веса от 60 до 77 кг и роста от 160 до 180 см), интернированных и питаемых в лаборатории кафедры в течение 28—52 дней. Выпот собирали во время мышечной деятельности (6—8 раз по 20—30 мин. работы на циклоэргометре, чередовавшиеся с перерывами по 30—40 мин.) в полиэтиленовых муфтах, надеваемых на различные части тела. Объем выпота находили путем расчета баланса, принимая во внимание полученное организмом количество жидкости, выделения и дыхательные обмены, а также влажность вдыхаемого воздуха. Было проанализировано свыше 1 000 проб, собранных при различных условиях. Статистическая обработка полученных результатов выявила факторы изменения содержания общего небелкового азота в выпоте, а также значение потерь этого элемента при потении.

Если сбор выпота производится с той же части тела и при тех же условиях температуры и питания, концентрация азота изменяется в зависимости от индивидуума между 0,22 и 0,76 г/л, при среднем значении $0,45 \pm 0,012$. Выпот на конечностях содержит на 18—35% ($p < 0,03$) больше азота, чем выпот, одновременно собранный с груди.

В течение рабочего дня, по мере того как мышечная деятельность и продолжительность выпота продлеваются, концентрация азота в выпоте понижается ($p < 0,05$).

Если количество выпота превышает 400 г/час, содержание азота понижается от $0,451 \pm 0,026$ до $0,363 \pm 0,016$ ($p < 0,02$).

При повторении той же мышечной деятельности (тренировке) в течение трех недель при $20 \pm 2°C$ не было замечено значительных изменений содержания азота в выпоте, собранном с груди.

При неизменности всех других условий (мышечной деятельности, микроклимата и т.д.) и при увеличении белкового рациона от 65—75 до 105—115 г в день, содержание азота в выпоте повысилось на 18,5% ($p < 0,01$).

Для выяснения потерь азота через выпот при мышечной деятельности только путем определения объема выпота, без сбора и анализа проб, можно принять среднее содержание равным 0,45 г/л для „комфортабельной" среды, или 0,36 г для жаркой среды, когда объем выпота превышает 400 г в час.

При $20 \pm 2°C$ потеря азота через выпот во время мышечной деятельности изменялась в зависимости от индивидуума от 43 до 106 мг/м²/час, при среднем значении $60 \pm 1,64$. Если деятельность протекала при $35 \pm 2°C$, количество азота, потерянного через выпот, повысилось в среднем на 45% ($p < 0,001$).

В течение мышечной деятельности, потеря азота через выпот представляла 22% (при $20 \pm 2°C$) и 28% (при $35 \pm 2°C$) общих выделений через почки и через выпот (рассчитанные на 1 м², в час).

Количество азота, потерянного через выпот, может доходить до 98% значения баланса (разность между введенным и выделенным азотом) и влияет не только на значение баланса, но и на то, как интерпретируют протекание белкового обмена.

Пренебрежение потерями азота через выпот является одной из главных причин несоответствия результатов исследований, касающихся влияния мышечной деятельности на азотный обмен.

RECHERCHES SUR LA DÉPERDITION D'AZOTE PAR TRANSPIRATION

RÉSUMÉ

Dans une étude sur le besoin en protéines de l'homme par la méthode du bilan on a déterminé avec régularité l'élimination d'azote dans les selles, l'urine et la sueur. Les recherches ont été effectuées sur 30 hommes sains (âgés de 21 à 28 ans, pesant 60 à 77 kg et mesurant 160 à 180 cm) internés et alimentés pendant 28 à 52 jours dans le laboratoire fonctionnant près la chaire de physiologie. La sueur a été récoltée dans des manchons en polyéthylène appliqués sur diverses parties du corps pendant une activité musculaire (6—8 reprises de 20—30 minutes chacune d'effort au cyclo-ergomètre, séparées par des pauses de 30—40 minutes) et son volume déterminé à l'aide du bilan, en tenant compte de l'apport, des éliminations, des échanges respiratoires et de l'humidité de l'air inspiré. On a analysé plus de 1 000 échantillons récoltés dans des conditions variées. L'interprétation statistique des résultats a mis en évidence les facteurs de variation de la teneur en azote total non protéique de la sueur ainsi que l'importance de la déperdition d'azote par la transpiration.

Si la récolte de la sueur a été faite sur la même région et dans les mêmes conditions de température et d'alimentation, la teneur en azote varie d'un individu à un autre entre 0,22 et 0,76 g au litre, c'est-à-dire en moyenne de 0,45 $\pm$ 0,012. La sueur sur les membres contient 18—35% ($p < 0{,}03$) plus d'azote que celle récoltée simultanément sur la poitrine.

Pendant la même journée de travail, à mesure que l'activité musculaire et la durée de la transpiration se prolongent, la teneur en azote de la sueur décroît ($p < 0{,}05$).

Lorsque le volume de la sueur a dépassé 400 g/h sa teneur en azote décroît de 0,45 $\pm$ 0,026 à 0,363 $\pm$ 0,016 ($p < 0{,}02$).

La répétition d'une même activité musculaire (entraînement) pendant 3 semaines à 20°C $\pm$ 2 n'amène aucune modification significative dans la teneur en azote de la sueur récoltée sur la poitrine.

En maintenant constantes toutes les autres conditions (activité musculaire, microclimat, etc.) après majoration de la ration en protéines de 65—75 à 105—115 g par jour, la teneur en azote de la sueur a augmenté de 18,5% ($p < 0{,}01$).

Afin d'évaluer la déperdition d'azote par la sueur pendant l'activité musculaire seulement par la détermination du volume de sueur sans avoir à récolter et à analyser des épreuves, on peut employer la teneur moyenne

de 0,45 g/l pour une ambiance confortable ou de 0,36 g/l pour une ambiance chaude, lorsque le volume de sueur dépasse 400 g à l'heure.

A 20°C ± 2 la déperdition d'azote par transpiration au cours de l'activité musculaire a varié d'une personne à l'autre entre 43 et 106 mg/m²/h, en moyenne de 60 ± 1,64. Pour des efforts déployés à 35°C ± 2, la quantité d'azote perdu par la sueur a augmenté de 45% ($p < 0{,}001$) en moyenne.

Au cours de l'activité musculaire, la perte en azote par la sueur a représenté de 22% (à 20 ± 2°C) jusqu'à 28% (à 35 ± 2°C) du total des éliminations par voie rénale et par la transpiration (toutes les deux rapportées au m² et à l'heure).

La quantité d'azote perdue par transpiration peut atteindre jusqu'à 98% de la valeur du bilan (la différence entre l'apport et les éliminations) et elle influe non seulement sur le volume de celui-ci mais aussi sur la manière d'interpréter la direction vers laquelle évolue le métabolisme protidique.

L'omission des pertes en azote par transpiration constitue une des principales causes de divergence entre les conclusions des recherches concernant l'effet de l'activité musculaire sur le métabolisme azoté.

BIBLIOGRAFIE

1. ARAKI Y., S. ANDO, Jap. J. Physiol., **3**, 211 (1953).
2. ARGUTINSKI P., Pflugers Arch. ges. Physiol., **46**, 594 (1890).
3. BARNEY E. R., J. Am. Med. Ass., **85**, 1373 (1925) și **87**, 1827 (1926).
4. BASS D. E., C. R. KLEEMAN, M. QUINN, J. Clin. Invest., **32**, 736 (1953).
5. BENEDICT F. G., J. Biol. Chem., **1**, 263 (1906).
6. BERRY E., Biochem. Ztschr., **72**, 285 (1916).
7. BORCHARD W., Ergeb. Physiol., **31**, 96 (1931).
8. BOST R. W., P. BORGSTROM, Amer. J. Physiol., **79**, 242 (1926).
9. BÖTTNER H., B. SCHLEGEL, Ztschr. ges. exp. Med., **103**, 151 (1940).
10. BUETTNER K., J. Appl. Physiol., **6**, 229 (1953).
11. CAMERER W. Jr., Ztschr. Biol., **41**, 271 (1901).
12. CHATRON M., Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris), **15**, 1107 (1933).
13. CRAMER E., Arch. Hyg., **10**, 231 (1890).
14. CUTHBERTSON D. P., W. S. GUTHRIE, Biochem. J., **28**, 1444 (1934).
15. DALY C., D. B. DILL, Am. J. Physiol., **118**, 285 (1937).
16. DARKE S., Brit. J. Nutr., **14**, 115 (1960).
17. DILL D. B., F. G. HALL., H.T. EDWARDS, Am. J. Physiol., **123**, 412 (1938).
18. DURIG A., C. NEUBERG, N. ZUNTZ, Biochem. Ztschr., **72**, 253 (1916).
19. EIJKMAN C., Arch. path. Anat. Physiol., **131**, 147 (1893).
20. FREYBERG R. H., R. L. GRANT, J. Clin. Invest., **16**, 729 (1937).
21. GONȚEA I., P. ȘUȚESCU, S. DUMITRACHE, Igiena, *4*, 297 (1959); Arch. Sci. Physiol. (Paris), **13**, 99 (1959); Igiena, *2*, 111 (1960); Int. Ztschr. angew. Physiol. einschl. Arbeitsphysiol., **18**, 248 (1960); Вопросы Питания, *6*, 12 (1960); Fiziologia, *1*, 29 (1962); Arch. Sci. Physiol. (Paris), **16**, 97(1962).
22. GONȚEA I., P. ȘUȚESCU, F. JANTEA, Igiena, *3*, 249 (1959); J. Physiol. (Paris), **51**, 861 (1959); Fiziologia, *4*, 275 (1961).
23. JOHNSTON M. W., J. W. CONN, L. H. LOUIS, B. F. STEELE, Feder. Proc., **5**, 234 (1946).
24. KITTSTEINER C., Arch. Hyg., **73**, 275 (1911) și **78**, 37 (1913).
25. KRAUT H., MÜLLER -WECKER J., Ztschr. physiol. Chem., **320**, 241 (1960).
26. MC CANCE R. A., Lancet, **235**, 190 (1938).

27. MEZINCESCU M. D., C.R. Soc. Biol. (Paris), **126**, 540 (1937); Bull. Soc. Chim. Biol., **20**, 39 (1938).
28. MITCHELL H. H., HAMILTON T. S., HAINES W. T., J. Biol. Chem., **178**, 345 (1949).
29. MOREIRA M., R. E. JOHNSON, A. P. FORBES, F. CONSOLAZIO, Am. J. Physiol., **143**, 169 (1945).
30. MOSHER H. H., J. Biol. Chem., **99**, 781 (1933).
31. PLAGGEMEYER H. W., E. K. MARSHALL Jr., Arch., Int. Med., **13**, 159 (1914).
32. RIGGS L. W., J. Med. Res., **19**, 285 (1911).
33. SCHWARTZ I. L., J. H. THAYSEN, V. P. DOLE, J. Exp. Med., **97**, 429 (1953).
34. SCHWENKENBECHER A., SPITTA I., Arch. exp. Path. Pharmak., **56**, 284 (1907).
35. СИДОРОВА Л. М., Арх. Биол. Наук, **39**, 601 (1935).
36. TALBERT A. G., S. H. SILVERS, W. JOHNSON, Am. J. Physiol., **81**, 81 (1927).
37. THIODET J., RIBÈRE B., C. R. Soc. Biol. (Paris), **123**, 329 (1936).
38. VAN HEYNINGEN R., J. S. WEINER, J. Physiol. (London), **116**, 395 (1952).
39. VOIT K., Dtsch. Arch. klin. Med., **175**, 108 (1933).
40. ZUNTZ N., SCHUMBURG, Physiologie des Marsches Hirschwald, Berlin, 1901, p. 198.

OBȚINEREA SUCULUI PLASMATIC DIN SEMINȚE

DE

VICTOR GHEȚIE și LUCIA BUZILĂ

La frunze, sucul plasmatic se obține în prezent printr-un procedeu recomandat încă din 1939 de Mason și Phillis [1]. În esență, metoda constă în înghețarea-dezghețarea frunzelor, urmată de stoarcerea lor într-o presă de laborator, la o presiune care poate atinge 200 atm. În acest fel se obține sucul plasmatic, pe care autorii metodei îl consideră ca provenind din protoplasma dezintegrată. După Medvedev și colaboratori [2], obținerea sucului plasmatic are loc ca rezultat al ultrafiltrării citoplasmei prin membranele celulozice ale celulelor și epidermei, care rămîn de obicei intacte. Prin congelare se distrug numai structurile interne ale protoplasmei și pereții despărțitori protoplasmatici subțiri, în timp ce pereții celulozici, groși și rezistenți, rămîn intacți.

Sucul plasmatic conține cea mai mare parte a substanțelor care alcătuiesc citoplasma : proteine, lipide, glucide, acizi nucleici etc. [2] [3]. Deși sucul plasmatic al frunzelor reprezintă un produs care a fost utilizat cu rezultate satisfăcătoare pentru izolarea și studierea diferitelor componente ale citoplasmei, majoritatea autorilor preferă să folosească în acest scop extracte. Preferința este justificată deoarece, în comparație cu sucul plasmatic, extractele permit izolarea și purificarea mai completă a compusului studiat. În plus, modificînd caracteristicile solventului (natură chimică, pH, putere ionică) se pot dirija operațiile astfel ca extractele să conțină cît mai puține substanțe de balast față de compusul studiat.

După părerea noastră, sucurile plasmatice pot fi folosite cu succes numai în cercetările care urmăresc *influența exercitată de anumiți factori fizici sau chimici asupra unor substanțe aflate într-un mediu cît mai apropiat de cel care există în celula vie.* Spre deosebire de extracte, în sucurile plasmatice raporturile cantitative dintre componenții citoplasmei nu pot fi mult diferite de cele existente în celulă. De aceea putem considera, într-o primă aproximație, că sucul plasmatic este constituit din citoplasmă celulară destructurată. Aceasta permite extrapolarea fenomenelor observate în sucurile plasmatice la celula vie.

Încercărilor de extrapolare li se poate aduce obiecția că alcătuirea sucului plasmatic nu poate fi echivalentă cu aceea a citoplasmei celulare, deoarece substanțele se găsesc în celulă în alte raporturi spațiale, topografice, decît în suc. Lipsa de structură a sucului plsmatic face ca substanțe despărțite spațial de către infrastructurile celulare să intre în contact, formînd compuși noi — artefacte — care, evident, nu se găsesc în celula vie. Această obiecție serioasă face ca, dintr-o dată, să limităm folosirea sucurilor plasmatice numai la anumite cercetări speciale, în care existența probabilă a artefactelor să nu împiedice tragerea unor concluzii valabile.

O astfel de cercetare specială necesită problema crioproteinelor vegetale. Într-o lucrare anterioară [4], am arătat că răcirea extractelor apoase ale unor semințe determină precipitarea reversibilă a unei fracțiuni proteice denumită crioproteină. Bazați pe acest fenomen, am emis ipoteza că crioproteinele ar putea avea un rol important în procesul germinativ, determinînd temperatura minimă de germinație a semințelor. Ipoteza are punctul de sprijin principal în presupunerea că fenomenele observate în extractele apoase s-ar putea desfășura în mod similar și în celula vie.

Cum crioprecipitarea depinde nu numai de temperatură, ci și de concentrația proteică, concentrația în electroliți și neelectroliți și pH-ul soluției, este clar că fenomenele ce se observă în extracte ar putea fi complet diferite în celule. De aceea, pentru a avea o imagine a fenomenelor ce se petrec în celulă, este mult mai rațional să recurgem la sucurile plasmatice, care conțin elementele ce influențează crioprecipitarea la un nivel asemănător cu cel existent în celulele seminței.

În scopul folosirii sucului plasmatic din semințe la studiul fenomenelor de crioprecipitare, era deci necesar să găsim o metodă de obținere a lui, deoarece literatura de specialitate nu conține indicații în acest sens. Desigur că sucurile plasmatice ale semințelor pot fi utilizate și pentru alt fel de cercetări, ținînd însă seama ca scopurile lor să nu depășească limitele impuse de prezența probabilă a unor artefacte.

Obținerea sucului plasmatic implică serioase dificultăți experimentale, legate de conținutul mic în apă al semințelor (cele mai adeseori mult sub 20%). Gradul de hidratare scăzut al protoplasmei celulare nu permite aplicarea nici unui procedeu de scoatere a sucului plasmatic. De aceea, este necesară sporirea cantității de apă în celule, operație ce se poate realiza pe calea fiziologică a îmbibării semințelor. În urma imbibiției, biocoloizii protoplasmatici își refac învelișul de apă și astfel se declanșează procesele hidrolitice caracteristice germinației. Cum aceste transformări chimice schimbă raportul diferitelor componente din citoplasmă, semințele trebuie îmbibate un timp cît mai scurt posibil. Viteza și gradul de absorbție al apei diferă însă după natura semințelor. La semințele leguminoaselor, bogate în substanțe proteice, imbibiția este practic terminată în 12 ore. La alte semințe, cu materii de rezervă lipidice sau glucidice, imbibiția se face mai încet, fiind necesare, în condițiile noastre de lucru, 24 de ore. În sfîrșit, unele semințe se îmbibă mai greu, datorită cojii greu permeabile. În aceste cazuri se poate recurge la îndepărtarea prealabilă a cojii, ceea ce scurtează considerabil durata imbibiției. De altfel, imbibiția semințelor este o operație necesară nu numai fiindcă dă posibili-

tatea obținerii sucului plasmatic, ci și datorită faptului că crioprecipitarea trebuie studiată în semințe care își încep germinația, adică în semințe *îmbibate*.

Procedeul experimental este următorul:

S-au pus semințele la îmbibat în apă bidistilată, în cutii Petri la 27°C. După un interval de timp impus de viteza de imbibiție a seminței studiate, s-au scos semințele din apă și li s-a îndepărtat coaja cu ajutorul unui bisturiu. Semințele descojite au fost zvîntate pe o hîrtie de filtru, pentru a îndepărta apa de pe suprafața lor. S-au introdus apoi semințele într-un mojar și s-a adăugat peste ele azot lichid (— 195°C). Mojararea materialului înghețat s-a efectuat adăugînd din cînd în cînd azot lichid, pînă s-a obținut o pulbere fină. Pulberea a fost introdusă imediat în eprubete de centrifugă și s-a centrifugat la temperatura camerei, timp de 30 min la 21 500 g *).

Sub influența forței centrifugale, concomitent cu dezghețarea materialului, are loc și stratificarea acestuia. Prin examinarea microscopică a sedimentului s-a observat că la fundul eprubetei se depun celule întregi, puține la număr, care n-au fost vătămate prin mojarare. Urmează apoi fragmente celulare, membrane, nuclei și formațiuni intracelulare. Deasupra lor se găsește o zonă lichidă, sucul plasmatic. La suprafața lui este fixată o peliculă de grăsime. Sucul plasmatic a fost scos cu un tub capilar și s-a limpezit printr-o centrifugare de 10 min tot la 21 500 g.

Dacă azotul lichid lipsește, el poate fi înlocuit cu nisip de cuarț (Seesand, Merck p.a.). În acest caz noi am efectuat mojararea cu nisip de cuarț pînă la obținerea unei paste omogene, care a fost apoi centrifugată. Nisipul de cuarț s-a depus la fundul eprubetelor de centrifugă, nestînjenind formarea stratului de suc plasmatic.

Analiza sucurilor plasmatice s-a efectuat folosind următoarele metode:

Apa din semințe și substanța uscată a sucului plasmatic au fost determinate pe calea deshidratării în etuvă, la 105°C, a semințelor, respectiv a sucurilor [5].

pH-ul s-a măsurat numai cu ajutorul hîrtiilor indicatoare (Spezial-Indikator papier, Merck și pH-AN, Chemapol), deoarece s-a lucrat cu cantități mici de suc. Totuși, unele determinări au fost controlate prin metoda electrometrică, găsindu-se o corespondență satisfăcătoare.

Substanțele plastice au fost determinate cu ajutorul micrometodelor, deoarece în mod obișnuit se obțineau cantități mici de suc plasmatic (2—3 ml).

Proteinele au fost dozate prin micrometoda cu albastru de bromfenol, folosind pentru curba etalon proteina totală extrasă din cotiledoanele de bob [6]. Obținerea proteinei din bob s-a făcut după Klimenko [7] înlocuind însă operația de extragere a proteinei cu eter etilic în soxhlet prin cîteva spălări cu același solvent. Soluțiile etalon s-au preparat prin dizolvarea proteinei în NaOH 0,5 N.

Lipidele s-au determinat prin micrometoda cu negru de Sudan B, folosind ca etalon o soluție de trioleină [8].

Pentru dozarea glucidelor (substanțelor reducătoare) s-a folosit o modificare a metodei Hagedorn-Jensen, care permite măsurarea cantităților mari de glucide prezente în sucul plasmatic [9].

În sfîrșit, analiza imunoelectroforetică a fost efectuată cu ajutorul micrometodei Scheidegger [10], folosind tamponul borat-fosfat de pH 7,8 [11]. Concentrația tamponului în cuvă a fost de 0,14 M acid boric, iar în plăci de 0,042 M. S-a folosit un gel de agaroză de 1,5 g% [12].

*) În cursul centrifugării temperatura în eprubete se ridică la 30°C. Această temperatură nu are o acțiune nefavorabilă, sucurile astfel obținute neprezentînd deosebiri față de cele centrifugate la 16°C.

Potențial 20 V/cm, intensitate 0,8 mA/cm, durata migrării 2 ore. Serul imun a fost preparat față de proteina totală din cotiledoanele de bob, printr-un procedeu indicat într-o lucrare anterioară [13]. Difuzia s-a făcut la temperatura camerei timp de 24 de ore. Prelucrarea plăcilor s-a executat după metodele curente [14]. Extragerea proteinelor din sămînța de bob s-a efectuat cu tamponul borat-fosfat de pH 7,8, folosind un raport de extracție de 1 parte făină la 10 părți extractant. Operația s-a executat 30 min cu ajutorul unui agitator magnetic, după care s-a centrifugat omogenatul 15 min la 11 800 g. Supernatantul limpede a fost folosit simultan cu sucul plasmatic pentru analiza imunoelectroforetică.

Procedeul descris mai sus s-a aplicat la 23 de specii de semințe aparținînd filmului angiospermelor. După o imbibiție de 24 de ore, semințele au fost prelucrate în vederea obținerii sucului plasmatic. S-au semnalat trei categorii de semințe :

1) Semințe care cedează cu ușurință sucul plasmatic. Din această categorie fac parte : măzărichea (*Vicia sativa*), bobul (*Vicia faba*), mazărea (*Pisum sativum*), bumbacul (*Gossypium herbaceum*), susanul (*Sesamum indicum*), castravetele (*Cucumis sativus*), pepenele galben (*Cucumis melo*) și hrișca (*Fagopyrum esculentum*).

2) Semințe din care sucul plasmatic se obține în cantități mici. La această categorie aparțin : fasolea (*Phaseolus vulgaris*), lucerna (*Medicago sativa*), lintea (*Lens esculenta*), alunele de pămînt (*Arachis hypogeea*), ricinul (*Ricinus communis*), tomatele (*Solanum lycopersicum*), macul (*Papaver somniferum*), dovleacul (*Cucurbita maxima*), cînepa (*Cannabis sativa*), varza (*Brassica oleracea*) și ridichea (*Raphanus sativus*).

3) Semințe care nu cedează sucul plasmatic. Fac parte din această categorie : soia (*Soja hispida*), trifoiul (*Trifolium pratense*), inul (*Linum usitatissimum*) și floarea soarelui (*Helianthus annuus*).

Insuccesul încercărilor noastre de a obține suc plasmatic din ultimele patru specii de semințe poate fi cauzat atît de cantitatea foarte mare de lipide prezente în celulă (soia, in, floarea soarelui), cît și de gradul insuficient de îmbibare al protoplasmei (trifoi). Nu este totuși exclus ca aplicarea unei forțe centrifugale mai mari să permită separarea sucurilor plasmatice și în cazul acestor semințe.

Rezultatele analizelor chimice efectuate asupra unor sucuri plasmatice sînt concentrate în tabela nr. 1.

Din tabelă se evidențiază procentul ridicat de substanță uscată al sucurilor. Aceste valori se încadrează foarte bine în datele găsite în literatură pentru substanța uscată din citoplasma celulelor vegetale (10—25 g%), fapt care pledează pentru proveniența citoplasmatică a sucurilor. În sucuri se găsește o cantitate mare de substanță uscată, deoarece, spre deosebire de metoda Mason și Phillis, prin procedeul nostru de prelucrare, sucul plasmatic nu este un ultrafiltrat al citoplasmei, ci este citoplasma ca atare. Prin ultrafiltrare, o parte din conținutul celulelor este reținută de membranele celulare rămase intacte, de aceea în acest caz sucurile vor fi mai sărace în unele componente decît citoplasma. Acest fapt ne îndreptățește să considerăm că procedeul pulverizării țesutului congelat, urmat de o centrifu-

gare de mare turație, este superior celui indicat de Mason și Phillis pentru obținerea sucului plasmatic din frunze *).

Tabela nr. 1

Variația pH-ului, substanței uscate, proteinelor, lipidelor și glucidelor în sucul plasmatic al unor semințe *)**

Semințe			Suc plasmatic				
Denumirea	Timp de imbibiție (în ore) **)	Cantitatea de apă (%)	pH	Substanța uscată (g%)	Proteine (g %)	Lipide (mg%)	Glucide ml $S_2O_3Na_2$ N/75 la 0,1 ml suc
Bob (*Vicia faba*)	20 (12)	53,66	6,6	26,76	8,32	—	8,51
	48	60,24	6,6***)	20,71	7,32	233	8,13
Fasole (*Phaseolus vulgaris*)	48 (24)	62,53	6,8	21,29	4,24	127	7,89
Măzăriche (*Vicia sativa*)	12 (12)	50,20	6,6	28,05	8,12	129	8,92
	24	54,22	—	27,39	8,12	157	9,94
Mazăre (*Pisum sativum*)	48 (12)	57,90	6,8	20,17	5,28	248	7,04
Ricin (*Ricinus communis*)	48 (24)	55,17	6,5***)	13,33	5,56	154	5,65
Bumbac (*Gossypium herbaceum*)	48 (24)	74,47	6,7***)	10,88	4,34	175	6,43

*) Valorile din tabelă reprezintă media a trei determinări.
**) Valorile cuprinse în paranteze reprezintă timpul de imbibiție minim, suficient pentru obținerea sucului plasmatic.
***) Valori verificate și prin măsurarea electrometrică a pH-ului.

Valorile pH-ului înscrise în tabelă, arată o deviere de la neutralitatea caracteristică citoplasmei vegetale (6,8—7,0). Reacția slab acidă a sucurilor plasmatice s-ar putea datora fenomenelor cunoscute de acidifiere a protoplasmei, care survin după lezarea sau distrugerea celulei. Totodată, nu este exclus ca acidifierea să se petreacă și în celulele intacte, datorită produșilor de reacție ce se acumulează în urma proceselor biochimice inițiate prin îmbibarea semințelor. Din acest motiv, nu putem afirma categoric că sucurile plasmatice au un pH diferit de al protoplasmei semințelor din care provin.

Proteinele sînt prezente în concentrații mari în sucurile celulare. Valori de acest ordin de mărime nu se întîlnesc decît în unele umori și secreții (sînge, lapte etc.), fiind de cîteva ori mai mari decît concentrațiile proteice curente ale extractelor apoase. Diferența care se observă între concentrațiile proteice ale unor sucuri plasmatice provenite din semințe cu un conținut proteic asemănător se poate explica prin dispersarea incompletă și inegală a grăunciorilor de aleuronă în masa celulară, la unele semințe îmbibate (fasole, mazăre). În acest caz, centrifugarea scoate din citoplasmă și depune grăunciorii de aleuronă nedispersați, concentrația proteică a sucurilor micșorîndu-se. Concentrația proteică a sucurilor poate fi influențată la unele semințe și de durata imbibiției. Dacă acest fenomen nu se observă la măzăriche, cantitatea de proteine din suc rămînînd neschimbată în intervalul de 12—24 de ore, în schimb la mazăre concentrația proteică în sucul obținut la 48 de ore este de 1,5 ori mai mică

*) La semințe îmbibate nici chiar cu o presiune de 400 kg/cm² nu am reușit să obținem suc plasmatic.

decît cea din sucul semințelor îmbibate 20 ore (8,00 g%). Deoarece hidratarea celulelor nu crește în acest interval (20—48 de ore) într-o măsură atît de mare încît să dea seama de nivelul scăzut al concentrației proteice în suc, trebuie să admitem că după o imbibiție de 20 de ore se declanșează hidroliza intracelulară a proteinelor, caracteristică germinației leguminoaselor.

Lipidele din sucul plasmatic se găsesc sub formă liberă și legată. Lipidele libere se găsesc în cantitate mică în sucuri, deoarece cea mai mare parte a lipidelor de rezervă libere din celule se separă la suprafața sucurilor plasmatice, sub forma unei pelicule de grăsime. Astfel, sucurile au o transparență satisfăcătoare, apropiată de aceea a serului sangvin. Majoritatea lipidelor din sucuri se găsesc legate de proteine, sub forma unor complexe (cenapse) lipoproteice care sînt solubile în mediu apos. Aceste cenapse nu sînt artefacte, deoarece au fost puse în evidență în citoplasmă [15], îndeplinind un rol bine determinat în biosinteza proteinelor de rezervă [16]. Raportul lipide libere/lipide legate nu este identic în citoplasmă și în sucul plasmatic. De aceea, este posibil ca semințe care nu conțin decît cantități mici de lipide libere (măzărichea) să aibă în sucul plasmatic o concentrație lipidică egală cu cea din sucul plasmatic al semințelor bogate în grăsimi libere (ricinul).

Valorile găsite pentru glucide sînt desigur afectate de imperfecțiunea metodei, care, alături de glucide, dozează și celelalte substanțe reducătoare din sucul plasmatic. Dacă neglijăm aportul substanțelor reducătoare neglucidice și încercăm să exprimăm datele găsite în echivalent de glucoză, găsim că sucurile analizate conțin între 1 și 2 g% glucoză. Cantitatea mare de glucide demonstrează, ca și concentrația celorlalte substanțe plastice studiate, natura complexă a sucurilor plasmatice, pledînd pentru echivalența lor cu citoplasma celulară. În sprijinul acestei păreri se pot aduce și rezultatele măsurătorilor viscozimetrice efectuate asupra sucului plasmatic al semințelor de bob. Executînd măsurători la 18°C, s-a găsit că sucul are o viscozitate de 18 ori mai mare decît cea a apei distilate, valoare apropiată de cea aflată pentru citoplasma celulelor parenchimului de bob (de 24 de ori mai vîscoasă ca apa) [17].

Deoarece în atenția noastră se găsesc substanțele proteice care alcătuiesc citoplasma celulară, se pune întrebarea dacă în sucuri se găsesc *toate* fracțiunile proteice prezente în citoplasmă. Numai în caz că se poate da un răspuns afirmativ la această întrebare, rezultatele obținute pe sucurile plasmatice pot fi extrapolate la celulă. Pentru a elucida această problemă, am recurs la imunoelectroforeză.

S-au analizat comparativ proteinele extrase din citoplasma semințelor de bob față de cele din sucul plasmatic, folosind un ser imun anticotiledon de bob. Rezultatele sînt înfățișate în figura 1.

Din examinarea numărului și poziției liniilor de precipitare care se formează între serul imun și proteinele din extract, respectiv din suc, se desprinde concluzia că între cele două probe nu există nici o deosebire. În consecință, se poate considera că în sucurile plasmatice sînt prezente toate componentele proteice care alcătuiesc citoplasma.

În sfîrșit, sucurile plasmatice pot fi folosite în cercetare numai sub rezerva stabilității lor. Utilizînd transparența sucurilor ca indice al stabilității lor, am constatat că, la temperatura frigiderului (6—8°C), majoritatea sucurilor se mențin neschimbate, zile și chiar săptămîni. Numai din semințele de mazăre și bumbac s-au obținut sucuri mai instabile, ce se tulbură în 24 de ore și depun un precipitat fin, alcătuit în principal din substanțe proteice.

În general, se poate afirma că cea mai mare parte a sucurilor manifestă o stabilitate satisfăcătoare, ceea ce permite pe deplin întrebuințarea lor în cercetare.

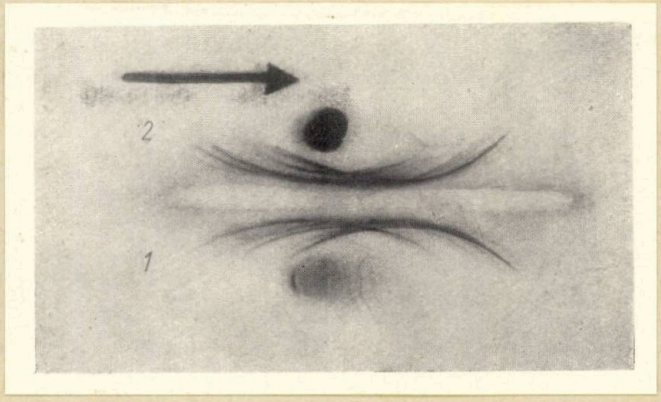


Fig. 1. — Imunoelectroforegrama proteinelor din extractele (*1*) și sucurile plasmatice (*2*) ale semințelor de bob (*Vicia faba*), îmbibate 24 de ore cu apă bidistilată la 27°C. Ser imun anticotiledon de bob. Tampon borat-fosfat, pH 7,8. Gel de agaroză 1,5 g%. Potențial 20 V/cm, intensitate 0,8 mA/cm, durata migrării 2 ore. Timp de difuzie 24 de ore, la temperatura camerei. Colorație cu azocarmin B.

Datele globale ale analizelor efectuate în această lucrare ne îndreptățesc să considerăm că sucul plasmatic reprezintă citoplasma de structurată a celulelor ce alcătuiesc semințele. Din acest motiv, sucurile plasmatice pot fi folosite ca „modele experimentale" pentru cercetarea fenomenelor de crioprecipitare din celulele semințelor. Datele obținute în această direcție vor fi publicate într-o lucrare viitoare.

Prezentată la redacție la 5 ianuarie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СОКА ИЗ СЕМЯН

РЕЗЮМЕ

Получение плазматического сока представляет значительные экспериментальные трудности, связанные с малым содержанием воды в семенах. Поэтому количество воды в клетках увеличивалось путем пропитывания семян бидистиллированной водой. Пропитанные семена растирали с жидким азотом до получения тонкого порошка. Порошок центрифугировали при 21 500 г, в течение 30 мин, и таким образом по-

лучали плазматический сок. Этим способом был получен плазматический сок 19-ти видов семян. Для соков, бобов фасоли, зеленой фасоли, гороха, рицина и хлопка, авторы проследили за изменением pH-а сухого вещества, а также за изменением белков, липоидов и сахаров. Результаты анализов позволяют считать, что плазматический сок представляет собой бесструктурную цитоплазму составляющих семена клеток.

Принимая во внимание их удовлетворительную устойчивость, соки были использованы авторами для изучения явлений криоосаждения.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Иммуноэлектрофореграмма белков экстрактов (1) и плазматических соков (2) семян бобов (Vicia faba), пропитанных в течение 24-х часов бидистиллированной водой при 27°С. Иммунизированная сыворотка противодолевая бобов. Буферный раствор борат-фосфата, pH=7,8. Гель агарозы 1,5 г%. Потенциал 20 V/см, интенсивность 0,8 ма/см, продолжительность миграции 2 часа. Продолжительность диффузии 24 часа, при комнатной температуре. Окраска азокарминoм В.

OBTENTION DU SUC PLASMATIQUE DES GRAINES

RÉSUMÉ

L'obtention du suc plasmatique des graines implique de graves difficultés expérimentales, liées à la faible teneur en eau des semences. C'est pourquoi on a augmenté la quantité d'eau dans les cellules par l'imbibition des graines d'eau bi-distillée. Les graines imbibées ont été réduites en poudre fine par pilage à l'azote liquide. La poudre a été centrifugée 30 minutes à 21 500 g et on a obtenu le suc plasmatique. On a préparé par ce procédé du suc plasmatique des graines appartenant à 19 espèces végétales. Sur les sucs de la fève, du haricot, de la vesce, du pois, du ricin et du coton on a observé la variation du pH, de la matière sèche, des protéines, des lipides et des glucides. Les résultats justifient les auteurs à considérer le suc plasmatique comme représentant le cytoplasme destructuré des cellules constituant les graines.

Étant donné qu'ils manifestent une stabilité satisfaisante, ces sucs sont employés par les auteurs pour l'observation des phénomènes de cryoprécipitation.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Immuno-électrophorégramme des protéines de l'extrait (1) et du suc plasmatique (2) des graines de fève (*Vicia faba*) imbibées pendant 24 heures d'eau bi-distillée à 27°C. Immun-sérum anti-cotylédon de la fève. Tampon borate-phosphate, pH = 7,8. Gel d'agarose 1,5 %. Potentiel 20 V/cm, intensité 0,8 mA/cm, durée de la migration 2 heures. Temps de diffusion : 24 heures à la température ordinaire. Coloration à l'azocarmin B.

BIBLIOGRAFIE

1. T. G. MASON, E. PHILLIS, *Experiments on the extraction of sap from the vacuole of the leaf of the cotton plant and their bearing on the osmotic theory of water absorption by the cell*, Ann. Bot., N. S., **3**, 531 (1939).
2. Ж. А. МЕДВЕДЕВ, Н. Н. ЗАБОЛОЦКИЙ, ШЕНЬ-ЦЗЯНЬ-СЯ, МО-СИ-МУ, Е. Г. ДАВИДОВА, Е. Р., ДАВИДОВ, *Выделение рибонуклеиновой кислоты из плазменного сока листьев растений и изучение особенностей её обмена*, Биохимия, **25**, 1001 (1960).
3. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Blocarea reacției de brunificare în vederea cercetării proteinelor din sucul celular al frunzei*, Studii și cercetări de biochimie, **III**, *2*, 181 (1960).
4. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Crioproteinele vegetale. Notă preliminară*, Studii și cercetări de biochimie, **V**, *1*, 65 (1962).
5. А. И. ЕРМАКОВ, В. В. АРАСИМОВИЧ, М. И. СМИРНОВА-ИКОННИКОВА, И. К. МУРРИ, *Методы биохимического исследования растений*, Гос. изд. сельск. лит., Москва-Ленинград, 1952, p. 32.
6. L. M. DZIALOSZYNSKI, *Colorimetric microdetermination of protein*, în *IV-th International Congress of Biochemistry*, Wien, sect. 17—13, 199 (1958).
7. В. Г. КЛИМЕНКО, *Выделение и очистка белков из растительного материала*, Укр. Биохим. Журнал, **24**, 499 (1952).
8. B. SWAHN, *Studies on blood lipids*, Scand. J. Clin. Lab. Invest., **5**, suppl. 9 (1953).
9. CH. S. HANES, *An application of the method of Hagedorn-Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars*, Biochem. J., **23**, 99 (1929).
10. J. J. SCHEIDEGGER, *Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
11. V. GHEȚIE, *Mărirea capacității de rezoluție electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat*, Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *3*, 397 (1961).
12. V. GHEȚIE, D. MOTET-GRIGORAS, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, Studii și cercetări de biochimie, **V**, *3*, 409 (1962).
13. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Cercetări imunochimice asupra germinației la bob* (Vicia faba), Studii și cercetări de biochimie, **V**, *4*, 541 (1962).
14. P. GRABAR, P. BURTIN, *Analyse immuno-électrophorétique*, Paris, Edit. Masson, 1960, p. 34.
15. G. HAUROWITZ, *Protein symplexes (conjugated proteins)*, în *W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Ed. Springer, 1958, vol. VIII, p. 333.
16. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Proteinele de rezervă și proteinele protoplasmatice din sămînța de fasole* (Phaseolus vulgaris), Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *2*, 241 (1961).
17. A. FREY-WYSSLING, *Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives*, New York, — Amsterdam — London — Brussels, Elsevier Publ. Comp. Inc., 1948, p. 110.

STUDIUL ACȚIUNII PROTECTOARE A UNOR GLUCIDE ASUPRA DENATURĂRII PRIN CĂLDURĂ A PROTEINELOR SERICE

DE

MEDARD KEREKES

Căutîndu-se substanțe cu acțiune protectoare față de denaturarea prin căldură a proteinelor serice, s-au obținut unele rezultate mai ales cu sărurile acizilor grași. Luck [1] a arătat că, în serul încălzit la 70—75°C, cînd globulinele coagulează, albuminele sînt protejate de sărurile acizilor grași cu 7 și 8 atomi de carbon. Klevena [2] obține protejarea față de coagulare a albuminelor serice ținute timp de o oră la 175°C, în prezența acidului perfluorooctanoic.

Coagularea și denaturarea nu sînt însă noțiuni identice, lipsa coagulării nu înseamnă nicidecum că nu s-a produs o denaturare a proteinei. Într-adevăr, Ellenbogen și Maurer [3] au dovedit că albumina lui Klevens are proprietăți complet schimbate față de cea nativă. Loșeva și Tiperovici [4] constată că nici acizii grași nu asigură albuminelor lipsa totală a denaturării ; după încălzire în prezența acestor substanțe, are loc o schimbare a punctului izoelectric.

Beilinsson [5] a descris, încă din 1929, acțiunea protectoare a glicereinei și zaharozei față de denaturarea termică a proteinelor serului sanguin. Aceste experiențe au fost reluate în 1946 de către Hardt și colaboratori [6]. După Putnam [7], acțiunea protectoare este cea mai pronunțată la glucoză, fructoză și zaharoză și pare a fi proporțională cu solubilitatea substanței. Pînă în prezent s-a dat acestui fenomen o explicație îndestulătoare.

În prezenta lucrare expunem rezultatele obținute în urma studierii acțiunii protectoare a unor glucide față de denaturarea prin căldură a proteinelor serice, avînd în vedere interesul practic pe care îl prezintă stabilizarea proteinelor în cursul conservării și mai ales al liofilizării plasmei, cînd aceasta este expusă unor temperaturi destul de ridicate.

METODA DE LUCRU

Am studiat efectul următoarelor glucide : *d*-arabinoza, *d*-glucoza, *d*-galactoza, *d*-manoza, *d*-fructoza, maltoza, lactoza şi zaharoza. Substanţele au fost dizolvate, în diferite concentraţii, în ser sanguin uman normal, soluţia fiind apoi expusă încălzirii în ultratermostatul Höppler, în eprubete mici, timp de 10 minute.

În concentraţiile de peste 30%, dizolvarea glucidelor s-a obţinut prin încălzirea prealabilă a eprubetelor la 38°C, timp de 10 min.

Modificările produse sub acţiunea căldurii, respectiv acţiunea protectoare a substanţelor studiate, s-au urmărit cu ajutorul electroforezei pe hîrtie. Este cunoscut că încălzirea peste 58°C provoacă modificarea vitezei de migrare a fracţiunilor proteice, acestea manifestînd o tendinţă spre omogenizare, cu apariţia unei noi faţiuni care din punctul de vedere al mobilităţii se plasează în zona *alfa*- şi *beta*-globulinelor [8] [9]. Paralel cu ridicarea temperaturii, aceste modificări devin tot mai accentuate, iar prin încălzire peste 66°C serul coagulează.

Electroforeza a fost executată pe hîrtie Whatman nr. 1, folosindu-se tampon Dittmer (veronal de sodiu — acetat de sodiu) cu pH 9,0 şi f.i. 0,06. Benzile au fost colorate cu albastru de bromfenol, iar evaluarea rezultatelor s-a făcut prin compararea cu proteinograme martor. Ca martor am folosit seruri neîncălzite, conţinînd glucide în aceeaşi concentraţie cu probele. Trebuie menţionat că glucidele în concentraţie pînă la 50% nu influenţează practic aspectul proteinogramei (se constată doar o mică scădere a vitezei de migrare). În concentraţii peste 50% însă, aspectul proteinogramei devine mult deformat, probabil datorită faptului că marea cantitate de glucide blochează drumul curentului. În asemenea cazuri, după încălzire, serurile au fost diluate cu un volum egal de tampon.

Dizolvarea unor cantităţi mai mari de glucide în ser măreşte volumul acestuia. Pentru a evita efectul diluţiei asupra denaturării, martorii încălziţi s-au efectuat cu seruri diluate prin tampon la volumul acelora cu glucide.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru orientare, glucidele amintite s-au întrebuinţat în concentraţie de 10%, serul fiind încălzit la 65°C. Toate substanţele cercetate au manifestat o anumită acţiune protectoare, cea mai accentuată observîndu-se în cazul galactozei glucozei şi fructozei. În continuare, am studiat numai acţiunea acestor substanţe, dizolvîndu-le în concentraţii de 20, 30, 40 şi 50%.

Cercetările efectuate la 65°C au arătat că puterea de protecţie creşte paralel cu concentraţia glucidului. Protecţia maximă la această temperatură se obţine, în cazul glucozei, încă de la concentraţia de 30% (fig. 1), iar în cazul glucozei şi fructozei de la 40%.

În continuare, am trecut la studierea efectului protector al glucidelor la temperaturi mai ridicate. În concentraţie de 30%, galactoza, glucoza şi fructoza au inhibat coagularea serului la 70 şi 75°C. Proteinograma serului ţinut la 70°C diferă numai cu puţin de aceea a serului nativ, dar la 75°C se constată modificări importante. La 80°C, serul devine vîscos, iar la 90°C coagulează.

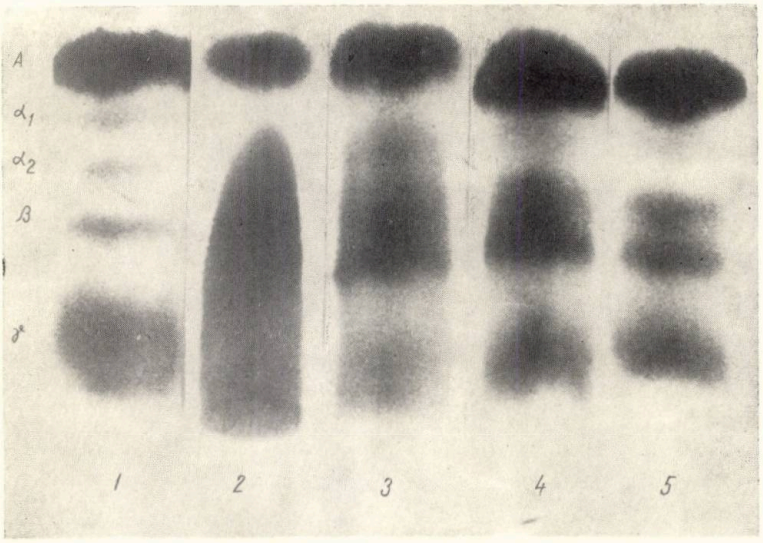


Fig. 1. — Ser denaturat la 65°C, timp de 10 minute.

1 — martor;
2 — ser denaturat fără galactoză;
3 — ser denaturat în prezență de galactoză 10%;
4 — ser denaturat în prezență de galactoză 20%;
5 — ser denaturat în prezență de galactoză 30%.

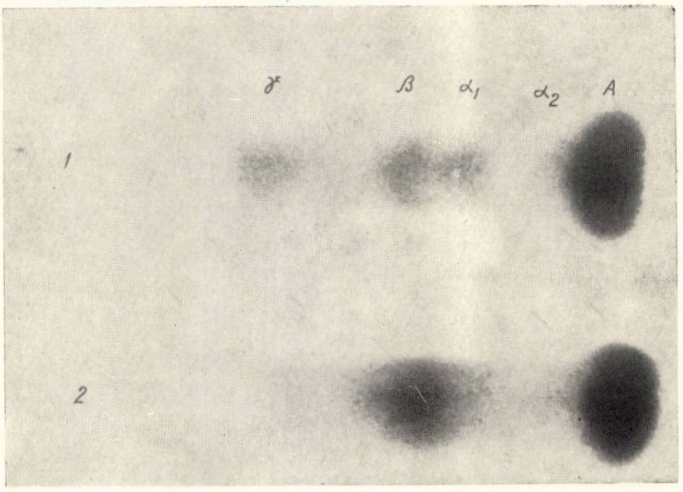


Fig. 2. — Ser denaturat timp de 10 minute în prezența unei soluții de galactoză 50%.

1 — la 70 și 75°C;
2 — la 80°C.

Acțiunea protectoare a glucidelor crește paralel cu concentrația lor. La concentrația de 50%, proteinele sînt complet protejate de denaturare. La temperaturile de 70 și 75°C, proteinograma se modifică, fără însă ca mobilitatea albuminelor să fie schimbată (fig. 2). La 90°C, însă, serul coagulează.

Deoarece galactoza nu se dizolvă bine în ser în concentrații de peste 50%, iar glucoza și fructoza sînt asemănătoare în privința efectului lor protector, în continuare am lucrat numai cu glucoză, constatînd că aceasta, în concentrație de 70%, protejează complet proteinele serice față de temperaturile de 70 și 75°C. La 80°C începe deformarea proteinogramei, dar serul nu coagulează nici la 90°C și nici chiar la 100°C. La aceste temperaturi, fracțiunile sînt însă perfect omogenizate și proteinograma nu mai arată decît o singură fracțiune.

Efectul protector al glucidelor se explică probabil prin izolarea mecanică și electrică a moleculelor proteice. În prezența soluțiilor mai concentrate de glucide, probabilitatea ciocnirii și a formării legăturilor disulfidice între moleculele proteice este mai redusă.

Spre deosebire de datele din literatură, puterea de protecție cea mai pronunțată a fost găsită în cazul glucozei. Deoarece solubilitatea acesteia este mai redusă decît a glucozei, se poate presupune că efectul protector se datorează în primul rînd nu solubilității glucidelor, ci unei alte proprietăți. Se pare că ar juca un rol în această privință configurația și constanta dielectrică.

CONCLUZII

Unele substanțe glucidice, îndeosebi galactoza, glucoza și fructoza, protejează în mare măsură fracțiunile protidice din ser față de acțiunea denaturantă a căldurii. Această acțiune este mai mare decît aceea a acizilor grași, care își exercită efectul protector numai asupra albuminei. Acțiunea protectoare a galactozei întrece pe cea a glucozei și fructozei.

Prezentată la redacție la 22 octombrie 1962

Laboratorul de biochimie,
Baza de cercetări științifice Tîrgu-Mureș
a Academiei R.P.R.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ САХАРОВ НА ДЕНАТУРИРОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕПЛА

РЕЗЮМЕ

Был изучен электрофоретическим путем защитный эффект следующих соединений: d-арабинозы, d-глюкозы, d-галактозы, d-манозы, d-фруктозы, мальтозы, лактозы и сахарозы. Наиболее выраженное

действие оказали галактоза, глюкоза и фруктоза. Защитное действие сахаров увеличивается параллельно их концентрации. При концентрации в 70%, глюкоза препятствует свертыванию сыворотки даже при температуре кипения, а начальная электрофоретическая подвижность фракций сохраняется до 75°C.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Денатурированная сыворотка при 65°C в течение 10 мин. *1* — контроль; *2* — денатурированная сыворотка без галактозы; *3* — денатурированная сыворотка в присутствии галактозы (10 %); *4* — денатурированная сыворотка в присутствии галактозы (20 %); *5* — денатурированная сыворотка в присутствии галактозы (30 %);

Рис. 2. — Денатурированная сыворотка, в течение 10 минут, в присутствии раствора галактозы (50 %). *1* — при 70° и 75°C; *2* — при 80°C.

ACTION PROTECTRICE DE CERTAINS GLUCIDES SUR LA DÉNATURATION PAR LA CHALEUR DES PROTÉINES SÉRIQUES

RÉSUMÉ

On a étudié à l'aide de l'électrophorèse l'effet protecteur des substances suivantes : *d*-arabinose, *d*-glucose, *d*-galactose, *d*-mannose, *d*-fructose, maltose, lactose et saccharose. L'effet le plus prononcé a été exercé par le galactose, le glucose et le fructose. L'action protectrice des glucides augmente parallèlement à leur concentration. A la concentration de 70 % le glucose inhibe la coagulation du sérum même à la température d'ébullition et la mobilité électrophorétique initiale est conservée jusqu'à une température de 75°C.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Sérum dénaturé à 65°C pendant 10 minutes. 1 — Témoin, ; 2 — sérum dénaturé en l'absence du galactose ; 3 — sérum dénaturé en présence du galactose à 10 % ; 4 — sérum dénaturé en présence du galactose à 20 % ; 5 — sérum dénaturé en présence du galactose à 30 %.

Fig. 2. — Sérum dénaturé pendant 10 minutes en présence d'un solution de galactose à 50 %. 1 — à 70° et 75°C ; 2 — à 80°C.

BIBLIOGRAFIE

1. J. M. LUCK, Discuss. Faraday Soc., **6**, 44 (1949).
2. H. B. KLEVENS, Nature, **176**, 879 (1955).
3. E. ELLENBOGEN, P. MAURER, Science, **124**, 266 (1956).
4. А. Л. ЛОШЕВА, С. ЦИПЕРОВИЧ, Коллоид. журн., **19**, 233 (1957).
5. A. BELINSSON, Bioch. Z., **213**, 399 (1929).
6. C.R. HARDT, I. F. HUDDLESON, C. D. Ball, J. Biol. Chem., **163**, 211 (1946).
7. F. W. PUTNAM, *Protein denaturation*, în H. Neurath, K. Bailey, *The proteins*, vol. I, part B, Academic Press, New York, 1953.
8. Г. В. ТРОИЦКИЙ, В. И. ОКУЛОВ, Биохимия, **23**, *4*, 601 (1958).
9. A. KOVÁCS, M. KEREKES, Zschr. Inn. Med., *4*, 187 (1961).

STUDIUL ELECTROFORETIC AL PROTEINELOR SERICE DENATURATE PRIN CĂLDURĂ

DE

MEDARD KEREKES

Denaturarea termică a proteinelor serice are ca urmare o serie de modificări ale proprietăților lor, printre care și schimbarea vitezei de migrare în cîmpul electric. Lucrările care au studiat acest fenomen sînt destul de numeroase, dar rezultatele obținute prezintă divergențe destul de marcante. Ne-am propus să studiem modificările survenite sub acțiunea căldurii în viteza de migrare a proteinelor serice, în condiții bine definite, și să facem o evaluare a datelor din literatură, pe baza rezultatelor obținute.

O cantitate de 0,5 ml de ser uman normal a fost ținută timp de 10 min în ultratermostat Höppler la temperaturile de 56, 58, 60, 62, 64 și 66°C, în eprubete bine închise cu dop de cauciuc. În unele cazuri timpul încălzirii a fost de 20 și 30 min. După încălzire, eprubetele au fost răcite la 20°C. Determinarea fracțiunilor proteice s-a făcut cu ajutorul electroforezei pe hîrtie. Benzile au fost colorate cu albastru de bromfenol, evaluarea s-a efectuat prin eluție cu NaOH N/50 și citire la fotocolorimetrul Lange. În unele cazuri, electroforeza s-a repetat după 24 de ore, pentru a se putea observa o eventuală renaturare a proteinelor.

Sub acțiunea căldurii, fracțiunile proteice din ser suferă următoarele modificări (fig. 1) : începînd de la 58°C, limita dintre fracțiunile *alfa*-2 și *beta* devine tot mai ștearsă, ca apoi, la 62°C, să dispară complet. În același timp, crește și cantitatea acestei fracțiuni nou apărute, în primul rînd în dauna *gamma*-globulinelor, a căror cantitate scade treptat, iar de la 58°C ele încep să migreze cu o viteză mai mare. Albumina este mai stabilă, spotul acesteia începînd să scadă practic numai de la 62°C, transformîndu-se într-o fracțiune cu o viteză de migrare mai mică. La 66° C, se constată o dispariție bruscă a spotului albuminei.

La 64 și 66°C, proteinograma devine tot mai deformată, din cauza absorbției mărite a proteinelor denaturate pe hîrtie. Din această cauză, determinarea cantității reale a fracțiunilor din serul ținut la aceste temperaturi nu mai este posibilă. Acest fenomen scade valoarea electroforezei

pe hîrtie în astfel de cercetări ; la electroforeza liberă un asemenea proces nu are loc.

Trebuie menționat că, la 64°C, și mai ales la 66°C, viscozitatea serului crește considerabil. Încălzind serul nediluat peste 66°C, acesta se coagulează în cîteva minute.

Modificările produse de acțiunea căldurii sînt ireversibile : după 24 de ore nu se constată practic nici o schimbare în cantitatea fracțiunilor (tabela nr. 1). Aceste date confirmă și faptul că în procesul de denaturare există forme intermediare stabile.

Tabela nr. 1

Cantitățile relative ale fracțiunilor proteice din serul sanguin uman încălzit la 60 și 62° C, determinate cu ajutorul electroforezei, imediat și la 24 de ore după denaturare

Temperatura (°C)	Momentul efectuării electroforezei	Albumină (%)	globuline %			
			alfa-1	*alfa*-2	*beta*	*gamma*
60	Imediat	57,3	3,8	13,2	14,0	11,7
60	După 24 de ore	56,9	3,9	13,5	14,4	11,3
62	Imediat	51,5	3,2	34,4		10,9
62	După 24 de ore	51,7	3,5	35,0		9,8

Rezultatele obținute corespund în linii mari celor descrise în literatură, în ceea ce privește schimbările mobilității fracțiunilor. În privința temperaturilor la care aceste modificări survin se constată însă deosebiri nete. Miyamoto și colaboratori [1] constată o scădere a fracțiunii albuminice încă de la 52°C (în 30 min), pe cînd, după Schultz [2], această fracțiune nu ar fi interesată în procesul de denaturare sub 65°C. Aceste deosebiri sînt totuși explicabile dacă se ține seama de faptul că denaturarea s-a făcut în condiții diferite. Este evident că modificările sînt direct proporționale cu temperatura și invers proporționale cu diluția. Datele din tabela nr. 2 ilustrează acest fapt : dacă timpul încălzirii se prelungește, modificările devin mai accentuate, fiind asemănătoare celor obținute la o temperatură mai înaltă, într-un timp mai scurt (tabela 2). Dacă se lucrează cu seruri diluate, trebuie luat în considerare și efectul electroliților din soluție, care pot să provoace atît accelerarea, cît și inhibarea denaturării.

Tabela nr. 2

Cantitățile relative ale fracțiunilor proteice din serul sanguin uman expus încălzirii timp de 10, 20 și 30 de minute la 66°C

Timpul încălzirii (min.)	Albumină (%)	globuline %			
		alfa-1	*alfa*-2	*beta*	*gamma*
10	57,3	3,8	13,2	14,0	11,7
20	53,1	3,3	33,0		10,6
30	48,7	2,9	38,5		9,9

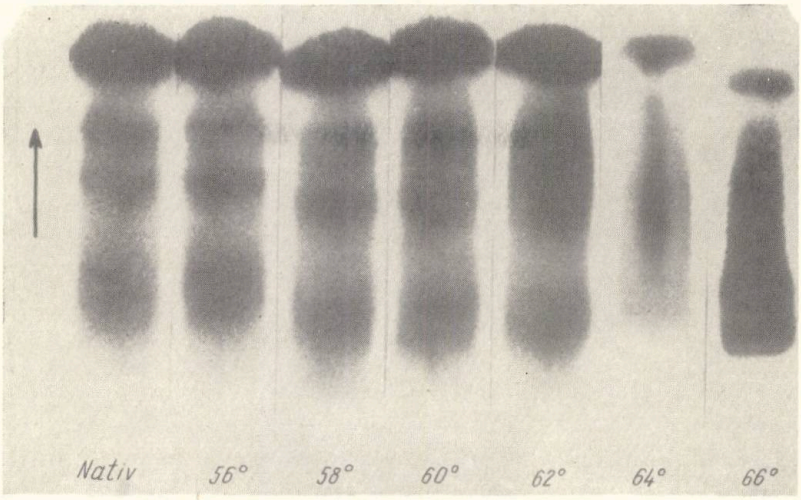


Fig. 1. — Electroforeza serului sanguin uman, denaturat timp de 10 minute la temperaturile de 56, 58, 60, 62, 64 şi 66° C (săgeata indică direcţia migrării).

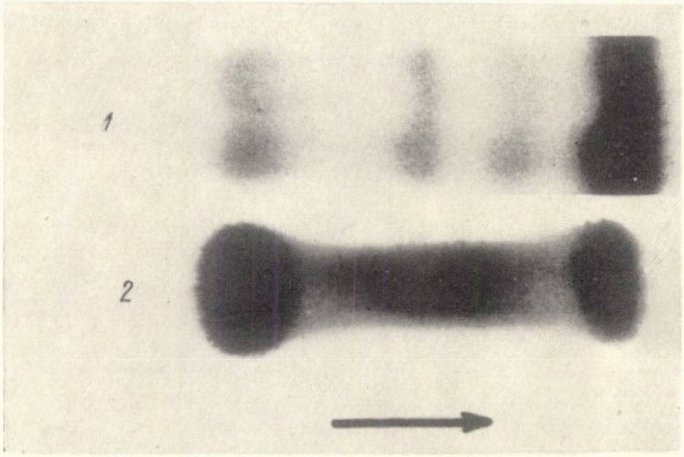


Fig. 2. — Electroforeza serului sanguin uman diluat cu tampon, denaturat prin căldură la 70°C timp de 10 minute (săgeata indică direcţia migrării).

1 — ser nativ; *2* — ser denaturat.

În cazul unei denaturări mai profunde, marea majoritate a proteinelor nu mai migrează la electroforeza pe hîrtie, ci rămîn la locul aplicării serului. Proteinograma serului diluat în proporție de 1 : 1 cu tampon veronal sodic — acetat de sodiu (pH 9,0, f.i. 0,06) și ținut 10 min la 70°C, ilustrează acest fapt în mod evident (fig. 2). În cursul unor experiențe efectuate cu ajutorul electroforezei libere, Kovács și Kerekes [3] au constatat că fracțiunea formată sub acțiunea căldurii la această temperatură migrează înaintea fracțiunii *gamma*.

Modificarea vitezei de migrare a diferitelor fracțiuni se explică prin schimbările survenite în structura secundară și terțiară a proteinelor. Tendința spre omogenizare permite concluzia că aceste schimbări sînt aceleași în cazul diferitelor fracțiuni. După părerea lui Troițki și Okulov [4], aceasta s-ar explica prin asemănarea fracțiilor proteice din ser în privința compoziției lor în aminoacizi.

În concluzie, trebuie subliniată încă o dată importanța condițiilor bine determinate (temperatură, timp de expunere, electroliți, pH) în studierea denaturării prin căldură a proteinelor serice, ținîndu-se seamă și de adsorbția crescută a proteinelor denaturate pe hîrtia de filtru. Această adsorbție este de altfel o însușire atît de caracteristică a proteinelor denaturate, încît ea poate servi chiar ca o măsură a denaturării.

Prezentată la redacție la 25 octombrie 1962

Laboratorul de biochimie,
Baza de cercetări științifice Tîrgu-Mureș
a Academiei R.P.R.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕПЛА

РЕЗЮМЕ

Были исследованы количественные изменения белковых фракций нормальной кровяной сыворотки человека, денатурированной под влиянием тепла, при 56—66°C. Подвижность альбуминов и α-1-глобулинов понижается, тогда как подвижность других фракций повышается и образуется новая фракция, которая с точки зрения подвижности находится в зоне α-и β-глобулинов. Альбумины представляют большую устойчивость по отношению к денатурированию, чем глобулины. Денатурированные белки сильно адсорбируются фильтровальной бумагой.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофорез человеческой кровяной сыворотки, денатурированной в течении 10 минут при температурах 56, 58, 60, 62, 64 и 66°C (стрелка указывает направление миграции).

Рис. 2—Электрофорез человеческой кровяной сыворотки, разбавленный буферным раствором, денатурированной под влиянием тепла при 70°C в течении 10 минут (стрелка указывает направление миграции). *1* — нативная сыворотка; *2* — денатурированная сыворотка.

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES SÉRIQUES DÉNATURÉES PAR LA CHALEUR

RÉSUMÉ

On a étudié les modifications quantitatives des fractions protéiques du sérum sanguin humain normal dénaturé par la chaleur à 56—66°C. La mobilité des albumines et des α-1-globulines décroît, tandis que celle des autres fractions augmente et une nouvelle fraction est formée, située du point de vue de la mobilité entre les α et les β-globulines. Les albumines montrent une plus grande stabilité à la dénaturation que les globulines. Les protéines dénaturées sont fortement adsorbées par le papier à filtrer.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorèse du sérum sanguin humain, dénaturé pendant 10 minute à la température de 56, 58, 60, 62, 64 et 66°C (la flèche indique la direction de la migration).

Fig. 2. — Electrophorèse du sérum sanguin humain dilué au tampon, dénaturé par la chaleur à 70°C pendant 10 minutes (la flèche indique la direction de la migration).

1. — Sérum natif; *2* — sérum dénaturé.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Miyamoto, Y. Sakagishi, R. Sano, *On the physico-chemical changes of serum protein under mild heat-treatment. III. On the electrophoretical changes of the protein fractions in heated serum*, Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., *1*, 55 (1957).
2. D. M. Schultz, *Effect of heat on the electrophoretic pattern of human serum proteins*, Am. J. Clin. Path., *1*, 9 (1959).
3. A. Kovács, M. Kerekes, *Elektrophoretische Untersuchung erhitzter Sera*, Zschr. Inn. Med. *4*, 187 (1961).
4. Г. В. Троицкий, В. И. Окулов, *Исследование „электрофоретической гомогенезации" белков* Биохимия, **23**, *4*, 601 (1958).

INFLUENȚA HIPEREMIEI EXPERIMENTALE, TIMPULUI ȘI TEMPERATURII ASUPRA EXOSMOZEI ELECTROLIȚILOR DIN PIELEA UMANĂ NORMALĂ

DE

MIOARA CÎRSTEANU

Diferitele săruri aflate în spațiile intra- și extracelulare ale pielii joacă un rol important în realizarea echilibrului ionic, iar apariția afecțiunilor dermice este deseori însoțită de variații în conținutul ionic al pielii [1] [2].

Urmărirea acestor variații în cazurile patologice, precum și determinarea valorilor balanței saline din pielea normală, s-au făcut atît pe piele excizată și îndepărtată de organismul viu [3] [4] [5], cît și în plasmă și în lichidul interstițial care irigă spațiul extracelular al pielii [6].

Deoarece pielea, în contact cu apa, pierde prin exosmoză o cantitate de săruri, în lucrări anterioare [7] [8] s-a elaborat o metodă de urmărire a exosmozei electroliților din piele, care permite cercetarea unor aspecte ale biochimismului pielii în condiții de structură intactă a materialului biologic viu. Cu această metodă s-a determinat exosmoza electroliților globali din pielea umană normală, precum și în unele afecțiuni ca eczeme, psoriazis etc., stabilindu-se variația valorilor conductometrice ale soluțiilor în care s-a produs exosmoza.

Aplicarea acestei metode în vederea aportului ei la stabilirea unui diagnostic sau ca indice biochimic de urmărire a tratamentului unei boli a făcut necesară studierea mai amănunțită a procesului de exosmoză și stabilirea condițiilor de lucru corespunzătoare.

De aceea, la sugestia acad. E. Macovschi, am urmărit : 1) exosmoza electroliților din piele în hiperemiile arteriale experimentale, 2) timpul de refacere a echilibrului salin din țesuturi după exosmoză și 3) influența temperaturii mediului înconjurător asupra exosmozei electroliților din piele.

Metoda exosmozei electroliților din piele, elaborată în lucrările anterioare [7] [8] prevedea utilizarea unui cristalizor cu diametrul de 4,5 cm și o capacitate de aproximativ 15 ml, care se umplea pînă la marginea de sus cu apă bidistilată la temperatura camerei și care se aplica, prin intermediul unei foițe de plexiglas, pe suprafața pielei. O dată realizat contactul între tegument și apa bidistilată din cristalizor, începea exosmoza electroliților din piele care dura 15 min, după care timp cristalizorul se îndepărta, iar în soluție se făcea determinarea conductometrică a ionilor. De aici reiese că, pentru o probă de exosmoză, la un timp dat, metoda permitea o singură determinare de conductibilitate ionică.

Pentru a urmări exosmoza electroliților din piele în hiperemia provocată, precum și influența temperaturii mediului asupra exosmozei electroliților din pielea umană normală, trebuiau luate probe repetate din soluția de exosmoză, pe care urmau să se facă determinări conductometrice, fără ca exosmoza să fie întreruptă. În acest scop am aplicat procedeul folosit de acad. E. Macovschi și care constă în folosirea unui inel de sticlă Jena, cu diametrul de 5 cm și înălțimea de 4 cm, fixat ușor printr-un cordon de cauciuc la locul unde se făcea determinarea. În interiorul inelului se pipetau 50 ml apă bidistilată. Lichidul era agitat continuu cu o baghetă de sticlă fără să se atingă suprafața pielii. În acest fel se luau la intervale de cîteva minute, probe de cîte 10 ml din soluția de exosmoză.

Determinările au fost făcute pe antebraț. În fiecare probă se măsura conductibilitatea electrică a soluției, cu ajutorul unei celule conductometrice de tip Arrhenius, cu 2 electrozi de platină în formă de disc, cu diametrul de 1 cm și grosimea de 1 mm, așezați orizontal la distanță de aproximativ 3 mm și avînd o constantă a vasului egală cu 0,0475. Dimensiunile vasului de sticlă, ținînd seama de distanța electrozilor de la fundul lui, permiteau determinarea conductibilității pe aproximativ 5—6 ml de lichid. Ca aparatură, am folosit un conductoscop cehoslovac. Determinările au fost făcute la 25°C, folosindu-ne de un ultratermostat Höppler. După fiecare determinare, celula se spăla cu apă bidistilată și se usca la suflător. Calculul conductibilității specifice se făcea după formula $\lambda = \frac{K}{R.n} - \lambda_a$ în care: K — reprezintă constanta vasului, R — rezistența din circuit în ohmi, n — valoarea citită pe scală, iar λ_a — conductibilitatea electrică specifică a apei bidistilate.

Înainte de a începe cercetarea propriu-zisă, trebuia stabilit timpul optim de exosmoză a electroliților din pielea umană normală și temperatura inițială optimă a apei bidistilată în care urmează să aibă loc exosmoza. Determinările au fost făcute după 5, 10, 15, 20 și 25 min de la începerea exosmozei, folosind apă bidistilată cu o temperatură de 0°C, 24°C și 40°C. După mai multe încercări, datele obținute au arătat că în decurs de 15 min exosmoza electroliților din piele atinge un prag maxim; după acest timp, de cele mai multe ori valoarea conductibilității electrice a soluției se menține constantă sau începe să scadă. Exosmoza diferiților ioni din piele nu este influențată de temperatura inițială a apei bidistilate în care se produce exosmoza.

O dată stabilite aceste condiții de lucru, am trecut la cercetarea factorilor care fac obiectul acestei lucrări.

Dată fiind atît legătura creată de către forțele hidrodinamice între sistemul circulator și țesutul cutanat, cît și dependența echilibrului salin din piele de permeabilitatea pereților vaselor sanguine aferente și eferente, am urmărit exosmoza electroliților din piele în hiperemiile arteriale experimentale.

Hiperemia se provoca prin frecarea pielei cu o baghetă timp de 15 min, după care se trecea la determinări de exosmoză pe porțiunea de piele înroșită, în condițiile arătate mai înainte.

Din datele obținute se constată că valorile conductibilității electrice a soluțiilor provenite din exosmoza electroliților pe pielea caracterizată de hiperemie sînt totdeauna mai scăzute față de cele obținute prin exosmoza electroliților pe pielea normală a regiunilor simetrice, nesupusă nici unui tratament. Aceasta este contrar așteptării ca o mărire a capilarelor sanguine și o creștere a fluxului sanguin să ducă la o creștere a cantității

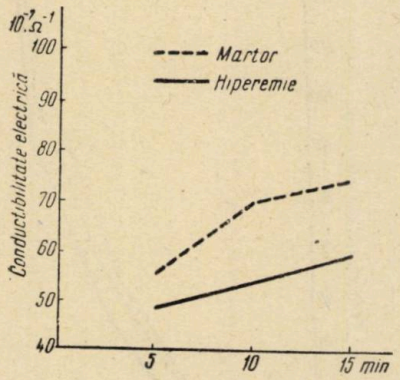


Fig. 1. — Exosmoza electroliților din piele în timpul hiperemiei arteriale experimentale.

——— exosmoza electroliților pe porțiunea de piele caracterizată de hiperemie;

--------- exosmoza electroliților pe pielea considerată martor.

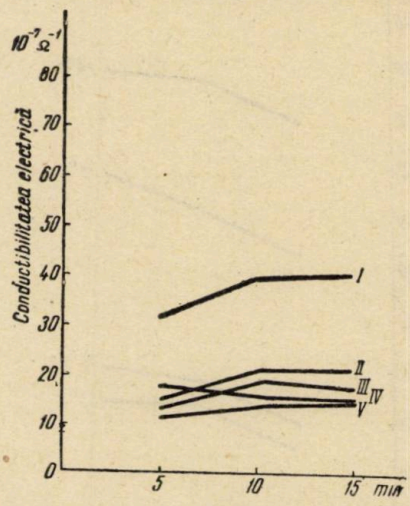


Fig. 2. — Exosmoza electroliților din piele repetată la interval de 3/4 oră pe aceeași suprafață de piele.

globale de electroliți în piele și, în consecință, la o exosmoză de ioni mărită.

Deoarece însă hiperemia arterială se caracterizează prin umplerea crescută a capilarelor și arteriolelor lărgite cu sînge care trece repede prin porțiunea respectivă și care, datorită vitezei, nu cedează suficient oxigen țesuturilor și nu se încarcă îndeajuns cu bioxid de carbon [9], s-ar putea ca în cazul de față fenomenul să fie asemănător și să nu existe suficient timp nici pentru un schimb normal de săruri între sînge și țesut.

De asemenea, s-ar putea ca prin frecare pielea să-și micșoreze permeabilitatea, drept răspuns la acțiunea factorului extern exercitată asupra ei.

Pe de altă parte, așa cum s-a mai arătat, în multe cazuri patologice echilibrul electroliților din piele se strică. De aceea, am urmărit factorii care contribuie la restabilirea rezervelor saline din piele. Pentru aceasta am considerat o porțiune de țesut sărăcită în electroliți prin supunerea ei

la procesul de exosmoză, și am urmărit timpul necesar restabilirii valorilor normale inițiale. Am lucrat pe piele umană normală, presupunînd permeabilitatea pielii ca factor nealterat din punct de vedere fiziopatologic,

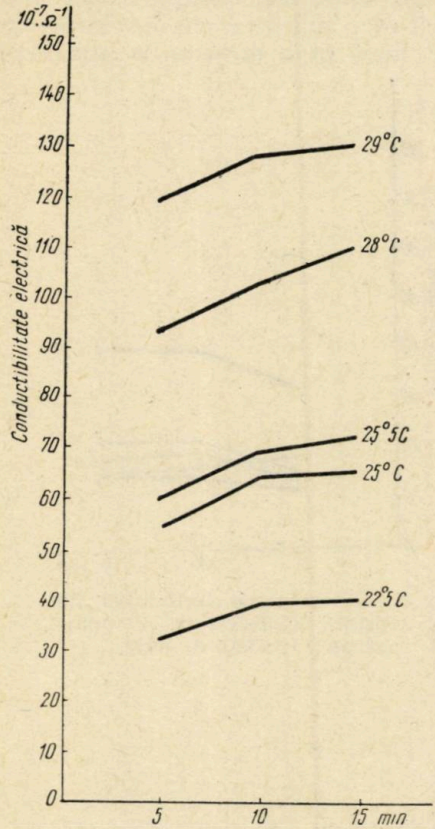


Fig. 3. — Influența temperaturii mediului înconjurător asupra exosmozei electroliților din piele.

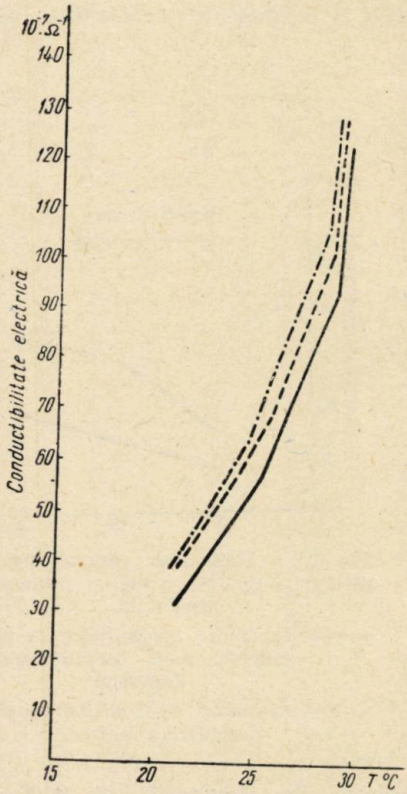


Fig. 4. — Creșterea exosmozei electroliților din piele în funcție de creșterea temperaturii mediului înconjurător.
——— exosmoza în 5 minute;
--------- exosmoza în 10 minute;
-·-·-·- exosmoza în 15 minute.

rămînînd constant de-a lungul unei experiențe. Am efectuat, în condițiile arătate mai sus, determinări de exosmoză, repetate la anumite intervale de timp egale și alese arbitrar (3/4 oră, 1 oră și 3½ ore), utilizînd aceeași suprafață de piele.

S-a constatat că, după ce s-a produs o dată exosmoza, are loc în toate cazurile o scădere accentuată a valorilor conductibilității electrice a soluției, manifestată apoi, în mai mică măsură, la o a treia determinare. Dacă experiența continuă cu o a patra și o a cincea determinare, soluțiile respective dau valori conductometrice care încep să se confunde între ele, fiind totdeauna cuprinse între aceleași limite scăzute de $15-30.10^{-7}.\Omega-1$.

Se remarcă că, indiferent dacă timpul parcurs între două determinări de exosmoză este de 3/4 oră sau de $3^1/_2$ ore, rezerva salină a țesutului care a participat la exosmoză nu mai atinge valori comparabile cu cele determinate inițial.

Ținînd seama de faptul că pielea, prin funcția sa termoregulatoare, cedează o dată cu creșterea temperaturii o mai mare cantitate de apă și săruri, am urmărit variația exosmozei electroliților din piele în funcție de temperatura aerului, cuprinsă între 22°C și 29°C (fig. 3 și 4).

S-a constatat că exosmoza electroliților din piele este direct proporțională cu creșterea temperaturii mediului în limitele menționate, o dată cu ea crescînd și curba valorilor conductometrice ale soluțiilor în care s-a produs exosmoza. Determinările efectuate au dovedit că exosmoza electroliților din piele este cu atît mai sensibilă la variații mici de temperatură, cu cît temperatura crește. Astfel, între 22,5 și 25°C,la o creștere a temperaturii cu un grad, corespunde o creștere a conductibilității cu 9.10^{-7}. Ω^{-1}, între 25 și 28°C raportul este de 1/14, iar între 28 și 29°C conductibilitatea soluției se mărește cu 24.10^{-7}. Ω^{-1}.

Această constatare confirmă ipoteza făcută în lucrări anterioare [7] [8] cu privire la utilizarea acestei metode pentru administrarea unor cantități corespunzătoare și suficiente de soluții saline muncitorilor care lucrează în condiții de temperatură ridicată a mediului înconjurător.

Rezultatele expuse în această lucrare, precum și metoda exosmozei electroliților în general, deschid perspectiva unor cercetări biochimice în patologia pielei, în vederea obținerii de noi date care să contribuie la stabilirea evoluției proceselor biochimice respective, a diagnosticului sau a tratamentului terapeutic.

Prezentată la redacție la 30 ianuarie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЕМИИ, ВРЕМЕНИ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭКСОСМОЗ ЭЛЕКТРОЛИТОВ ИЗ НОРМАЛЬНОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе автор проследил за: 1) эксосмозом элетролитов из нормальной кожи человека, в случае, экспериментальной гиперемии; 2) временем, необходимым для восстановления солевого запаса части ткани, подвергнувшейся однократному процессу эксосмоза электролитов; 3) влиянием температуры окружающей среды на эксосмоз электролитов из нормальной кожи человека.

Было установлено, что в случае экспериментальной гиперемии, эксосмоз понижен, по сравнению с контрольным эксосмозом электролитов из кожи. После процесса эксосмоза кожа не отдает того же коли-

чества ионов при следующем эксосмозе, даже если между двумя определениями прошло 3 1/2 часа. Эксосмоз электролитов из нормальной кожи человека усиливается в зависимости от повышения температуры. Определения проводились путем измерения электропроводимости растворов, в которых протекал эксосмоз.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Эксосмоз электролитов из кожи во время экспериментальной артериальной гиперемии.

——— эксосмоз электролитов на части кожи в состоянии гиперемии;
--------- эксосмоз электролитов на коже, предназначенной для контроля.

Рис. 2. — Эксосмоз электролитов из кожи, для которой проводили 2 определения через промежутки по 3/4 часа на той же области кожи.

Рис. 3. — Влияние температуры окружающей среды на эксосмоз электролитов из кожи.

Рис. 4. — Рост эксосмоза электролитов из кожи, в связи с повышением температуры окружающей среды.

——— эксосмоз в течение 5 минут;
····· эксосмоз в течение 10 минут;
-·-·-· эксосмоз в течение 15 минут.

INFLUENCE DE L'HYPERHÉMIE EXPÉRIMENTALE, DU TEMPS ET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'EXOSMOSE DES ÉLECTROLYTES DE LA PEAU HUMAINE NORMALE

RÉSUMÉ

Dans le présent travail l'auteur a suivi *1*) l'exosmose des électrolytes de la peau humaine normale dans l'hyperhémie provoquée, *2*) le temps nécessaire à la reconstitution de la réserve saline d'une portion du tissu ayant déjà été soumis une fois au processus d'exosmose des électrolytes et *3*) l'influence de la température ambiante sur l'exosmose des électrolytes de la peau humaine normale. L'auteur constate que dans l'hyperhémie provoquée on obtient une exosmose diminuée par rapport aux témoins. Une fois soumise au processus de l'exosmose, la peau ne cède plus la même quantité d'ions à l'exosmose suivante, même si l'intervalle entre les deux déterminations est de 3 heures et demie. L'exosmose des électrolytes de la peau humaine normale augmente avec la température et cela d'autant plus que la température est plus élevée. Les déterminations ont été effectuées en mesurant la conductibilité électrique des solutions dans lesquelles l'exosmose s'est produite.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Exosmose des électrolytes de la peau pendant l'hyperhémie artérielle expérimentale.

——— Exosmose des électrolytes sur une portion de la peau en état d'hyperhémie;
--------- exosmose des électrolytes sur peau-témoin.

Fig. 2. — Exosmose des électrolytes de la peau réitérée à 3/4 d'heure d'intervalle sur la même portion de l'épiderme.

Fig. 3. — Influence de la température ambiante sur l'exosmose des électrolytes de la peau.

Fig. 4. — Accroissement de l'exosmose des électrolytes de la peau en fonction de l'élévation de la température ambiante.

——— l'exosmose pendant 5 minutes ;
--------- l'exosmose pendant 10 minutes ;
------- l'exosmose pendant 15 minutes.

BIBLIOGRAFIE

1. G. F. RUBINO, L. PETTINATI, G. CERRATO, G. MARTINO, *Cutaneous sodium and potassium in various morbid conditions*, Minerva Med., **49**, 3148 (1958).
2. A. REINBERG, J. BOURGEOIS-SPINASE, M. HINCKY, E. SIDI, *Metabolic studies in psoriasis. Skin potassium and plasma potassium chloride and alkaline values during clinical improvement*, J. Invest. Dermatol., **31**, 231 (1958).
3. WARREN R. FLEMING, *The role of hydrogen ion and potassium ion in the active transport of sodium across the isolated frog skin*, J. Cellular Comp. Physiol., **49**, 129 (1957).
4. FRED. M. SNELL, CAVIN P. LEEMAN, *Temperature coefficient of the sodium transport system of isolated frog skin*, Biochim. Biophys. Acta, **25**, 311 (1957).
5. A. LEAF, A. RENSHAW, *Ion transport and respiration of isolated frog skin*, Biochem. J., **65**, 82 (1957).
6. M. D. CYRIL MARCH, *Some physiological and clinical aspects of the water and electrolyted contents of the skin*, Med. Clin. N. Amer., **3**, 43 (1959).
7. E. MACOVSCHI, S. COMOROȘAN, *Konductometrische Untersuchungen der Electrolytexosmose aus der Haut*, Ärztliche Forschung, **12**, *5*, 2 (1958).
8. E. MACOVSHI, S. COMOROȘAN, *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliților din piele*, Studii și cercetări de chimie, **IV**, *3—4*, 271 (1956).
9. E. ALPERN, *Fiziopatologie*, București, Edit. medicală, 1956, p. 221.

DETERMINAREA RADIOCROMATOGRAFICĂ PE SCHIMBĂTORI DE IONI A SIDEROFILINEI ŞI IMPORTANŢA EI PENTRU DIAGNOSTIC

DE

V. BRATU, P. TEITEL şi GR. TURCU*

Transportul fierului în organism, de la locul de absorbţie intestinală şi de la cel al catabolismului hemoglobinei la organele de rezervă şi utilizare (măduvă), este asigurat de către o proteină serică, siderofilina sau transferina [9] [11].

Această proteină, care are o greutate moleculară de 90 000, se comportă electroforetic ca o $beta_1$-globulină (aproximativ 11% din această fracţiune) şi se găseşte în plasmă în concentraţie de 250 mg/100 ml, reprezentînd prin urmare 3% din proteinele totale [9].

Natura $beta_1$-globulinică a siderofilinei este dovedită de faptul că fierul radioactiv introdus intravenos se regăseşte la electroforeza pe hîrtie în zona $beta_1$-globulinelor.

În fracţionările cu alcool, după metoda Cohn, siderofilina este cuprinsă în fracţiunea IV—7 a globulinelor [13].

Siderofilina prezintă la pH 7 o afinitate deosebit de mare pentru fier; o moleculă de siderofilină poate lega 2 atomi de fier, căpătînd în urma acestei complexări o coloraţie roz palidă (roz „somon") [12], care nu prezintă însă nici o bandă de absorbţie caracteristică la analiza spectrofotometrică. Lipsită de fier, soluţia de transferină este incoloră [9] [11] [13] [16].

Întreaga cantitate a fierului din plasmă este legată de această proteină sub forma unui complex fier-siderofilină. În mod normal, fierul existent în circulaţie — a cărui concentraţie reprezintă sideremia — nu saturează însă decît o treime din cantitatea totală de siderofilină din plasmă. Restul de două treimi rămîn libere şi reprezintă *capacitatea latentă* (C.L.) sau „virtuală" de saturare cu fier a siderofilinei [9] [11] [16].

* Colaboratori tehnici: M. Jianu şi Gh. Niculescu.

Prin însumarea fierului seric (sideremiei) şi a capacităţii latente de saturare a siderofilinei (C.L.), se obţine *capacitatea totală de saturare* (C.T.), respectiv de transport a siderofilinei.

Cunoscînd că 1 miligram de siderofilină poate fixa 1,25 μg de fier [16], cantitatea totală de siderofilină din circulaţie (C.T.) se poate afla în mod indirect, prin determinarea şi însumarea nivelelor fierului seric şi a capacităţii latente (C.L.) de saturare cu fier a siderofilinei.

$$C.T. = \text{sideremie} + C.L.$$

În mod normal cele trei valori sînt :

— sideremie = 80—120 μg/100 ml
— siderofilină C.L. = 180—210 μg/100 ml
— siderofilină C.T. = 295—310 μg/100 ml

Raportul : fier plasmatic (sideremie)/capacitate totală (C.T.) a siderofilinei reprezintă *coeficientul* (*indicele*) *de saturare a siderofilinei* (normal : 30—35%).

Siderofilina totală prezintă în unele cazuri patologice modificări care nu sînt paralele cu modificările sideremiei, iar disocierea valorilor are importanţă pentru diagnosticul diferenţial al anemiilor hipocrome, în care eritrocitele au o încărcătură de hemoglobină sub cea normală. În anemiile hipocrome, datorite unei carenţe generale a organismului în fier (hiposideroză), cantitatea totală de siderofilină — şi în special de siderofilină liberă, necomplexată — creşte şi pune indicaţia tratamentului cu fier ; în anemiile hipocrome care nu se datoresc unei carenţe generale de fier (hipocromie fără hiposideroză), ci unui metabolism viciat al fierului, cu acumularea lui în depozite (sistem reticulohistiocitar, splină, ficat), siderofilina totală scade considerabil. În această situaţie, tratamentul cu fier nu numai că este ineficace, dar poate fi şi dăunător.

Aceste două stări extreme sînt caracterizate şi prin valorile respective ale coeficientului de saturare a siderofilinei, care scade în hipocromiile datorite hiposiderozei şi creşte în celelalte hipocromii.

În momentul de faţă este bine stabilit că siderofilina totală creşte în toate carenţele de fier şi scade în infecţii, tumori, leziuni parenchimatoase. Scăderea concentraţiei siderofilinei corespunde în general gravităţii tabloului clinic [9].

Tehnicile folosite pînă în prezent pentru determinarea siderofilinei pot fi încadrate în cîteva tipuri :

1. Saturarea *in vivo* cu fier a siderofilinei — prin administrarea intravenoasă a unor săruri de fier — şi determinarea creşterii consecutive a sideremiei [5].

2. Saturarea *in vitro* a serului cu fier în exces şi măsurarea intensificării culorii roz a complexului fier-siderofilină [12] [13] [15].

3. Saturarea *in vitro* a serului cu fier în exces şi dozarea colorimetrică a fierului, fie din excesul necomplexat, fie din complexul fier-siderofilină, după separarea acestor două fracţiuni de fier pe diferite căi (de exemplu : precipitarea globulinelor prin salifiere) [6] [13].

4. Saturarea *in vitro* a serului cu fier radioactiv în exces şi determinarea procentului de activitate fixat pe complexul fier-proteină, după îndepărtarea excesului de fier necomplexat [5] [16].

5. Precipitarea cantitativă a siderofilinei cu un antiser specific [12].

Făcînd o apreciere critică a acestor tehnici, putem afirma, pe baza experienţei noastre, că metodele bazate pe principii colorimetrice sînt supuse unor erori apreciabile, datorite atît slabei intensităţi şi lipsei de specificitate a culorii respective, cît şi factorului subiectiv ce intervine la determinările fără fotocelulă. Pe de altă parte, tehnicile imunologice sînt legate de greutatea obţinerii unui ser monovalent.

Metodele radiochimice, deşi cer o aparatură specială ce limitează aplicarea lor la anumite laboratoare, prezintă avantaje de rapiditate şi precizie mare, care fac ca ele să fie preferate acolo unde există această posibilitate.

În lucrarea de faţă prezentăm o tehnică radiochimică şi rezultatele obţinute în laboratorul nostru pe un număr de 20 de seruri normale, provenite de la donatori de sînge, şi 5 seruri patologice. Am utilizat o tehnică modificată de noi, bazată pe cele descrise de Bothwell [5] şi Tauxe [16].

Principiul acestei metode constă în suprasaturarea cu fier a siderofilinei, cu ajutorul unei soluţii de concentraţie şi activitate cunoscută, conţinînd fier radioactiv şi purtător (fier inactiv), îndepărtarea excesului de fier necomplexat prin adsorbţia lui pe o coloană de răşină schimbătoare de ioni şi determinarea radioactivităţii din complexul fier-siderofilină. Cantitatea de siderofilină liberă (capacitatea latentă) se calculează apoi prin raportarea radioactivităţii complexului fier-radioactiv-siderofilină la radioactivitatea iniţială a soluţiei saturante.

MATERIAL ŞI METODĂ

Apa şi sticlăria folosită se cere să nu conţină urme de fier (sticlă perfect neutră, care se va spăla cu deosebită grijă în aceleaşi condiţii ca pentru dozarea chimică a fierului; se va utiliza numai apă bidistilată în vase de sticlă neutră).

1. *Soluţia saturantă* de citrat feri-amoniacal se prepară din citrat de fier radioactiv (Fe^{59}) şi clorură ferică în felul următor:

Soluţia A: Într-un balon cotat de 1 000 ml se pun 20 mg clorură ferică anhidră sau 30 mg clorură ferică cristalizată. Această cantitate de clorură ferică conţine 6,9 miligrame fier.

Se adaugă 4—5 ml apă bidistilată şi, după dizolvare totală, se adaugă 4 picături de amoniac concentrat. Se lasă să se formeze precipitatul. Se spală pereţii balonului cu 10 ml apă bidistilată, lipsită de fier. Se încălzeşte balonul pe baia de apă la 56°C şi se adaugă treptat cîteva cristale de acid citric. Tot precipitatul galben-ruginiu de hidroxid feric format iniţial se dizolvă, soluţia căpătînd o culoare galbenă deschisă.

Se adaugă 400—500 ml apă bidistilată şi 4 picături de albastru de bromtimol. Soluţia devine galbenă intensă. Se adaugă amoniac concentrat pînă cînd culoarea devine galbenă-verzuie palidă. Se aduce apoi la semn cu apă bidistilată.

Concentraţia finală a soluţiei este de 6,9 μg fier/ml.

Soluţia finală: Într-un balon cotat de 25 ml se pipetează o cantitate din soluţia comercială de citrat de fier radioactiv (produsul „IFS-2" Amersham, cuprinzînd ioni ferici în soluţie salină izotonică cu 1% citrat de sodiu), ce conţine o activitate de 15—20 microcurii. Se adaugă o picătură de amoniac şi se aduce la semn cu soluţia A. Se calculează concentraţia finală de fier, ţinînd seamă de conţinutul în fier al soluţiei radioactive, care este indicat de producător.

Soluţia astfel obţinută, diluată 1 : 6, trebuie să dea la numărător cel puţin 10 fonduri cosmice pe ml.

Soluţia se verifică chimic în ceea ce priveşte conţinutul în fier.

2. *Tamponul de barbital (veronal)* : 6,4 g clorură de sodiu şi 2,3 g veronal sodic se dizolvă în 4—500 ml apă şi se adaugă 6 g veronal acid. Se aduce la 1 000 ml cu apă bidistilată : pH-ul final este 7,5.

3. *Răşina* : Amberlit IRA 410 (sau Amberlit IRA 401).

Deoarece nu toate granulele au acelaşi diametru, 90% au diametrul de 20—40 „mesh" şi 10% au diametrul mai mic, acestea din urmă se separă uşor prin spălări repetate în apă distilată. Răşina este ţinută apoi în HCl 3 N (24—36 de ore), spălată bine cu apă bidistilată lipsită de fier şi pusă în contact, pentru echilibrare, cu tamponul veronal. Se usucă la 95°C.

Toate operaţiile de pregătire a răşinei, în afară de îndepărtarea granulelor mici, se pot face în coloana de lucru, adică într-o biuretă cu diametrul de 1 cm, prevăzută cu robinet, în care s-a introdus la partea inferioară puţină vată de sticlă. Se adaugă răşina (5—6 cm înălţime), se taseză, se adaugă din nou un strat de vată de sticlă şi se fac apoi operaţiile arătate mai sus. Cum din răşină trebuie să se îndepărteze orice urmă de lichid care ar putea dilua soluţia ce o străbate, se aspiră tot acest lichid cu ajutorul unei trompe de vid. „Uscarea" este efectuată prin această operaţie.

Răşina trebuie verificată în ceea ce priveşte puterea de schimb ionic (soluţia saturantă, după ce străbate coloana de răşină, nu trebuie să mai conţină fier). De asemenea, ea trebuie să nu fixeze complexul fier-siderofilină (un contact de 3 zile între răşină şi ser nu trebuie să ducă la modificarea cantităţii de fier dozabil în ser).

Determinarea se face în felul următor :

La 1 ml ser se adaugă 1 ml soluţie saturantă şi după 10 minute se adaugă 5 ml soluţie tampon (complexul fier-siderofilină se disociază parţial dacă pH-ul este mai mic de 7 şi în proporţie mult mai mare dacă pH-ul este sub 6).

La 10 minute de la adăugarea tamponului, se fac 1—2 ţinte a 1 ml, care reprezintă ţintele de referinţă. Restul amestecului se trece prin coloana de răşină, prelucrată aşa cum s-a arătat mai sus. După un contact de 10 minute, se culege într-o eprubetă amestecul care a trecut prin coloană şi din el se fac ţinte a 1 ml.

La temperatura laboratorului şi la pH 7,45, fierul ionic din soluţia saturantă este fixat în cîteva secunde. Cantitatea de răşină necesară pentru a reţine fierul în cazul reacţiei noastre, ţinînd seama de capacitatea ei de schimb, este de 120 mg. Din motive pur practice şi comoditate de lucru, noi utilizăm cantităţi mult mai mari, deşi teoretic nu sînt necesare.

După indicaţiile date de Bothwell [5] şi de Tauxe [16], răşina, după spălare şi echilibrare, se usucă la 95°C. Schimbul ionic se face într-o eprubetă sub agitare, iar răşina este separată prin centrifugare. Ţintele sînt de 4 ml. Ţintele de referinţă se fac dintr-o soluţie ce conţine 1 ml soluţie saturantă şi 6 ml apă.

Noi am constatat că nu este obligatoriu ca răşina să fie uscată. Trebuie asigurate însă condiţiile pentru ca răşina să reţină tot excesul de fier, iar umiditatea ei să nu dilueze soluţia ce o străbate. În ceea ce priveşte schimbul ionic, folosirea unei coloane înlătură operaţia de centrifugare pentru separarea răşinei şi, prin aceasta, şansele de contaminare radioactivă se reduc, iar răşina se poate regenera uşor, chiar în coloana de lucru, în vederea unei noi determinări. (Regenerarea se începe totdeauna cu apă distilată. Dacă se introduce acid clorhidric de la început, proteinele din serul rămas în coloană precipită şi colmatează coloana).

Am renunţat de asemenea la pregătirea unei probe de referinţă formată din „soluţie saturantă-apă", folosind în acest scop 1—2 ml din amestecul, „ser-soluţie saturantă-tampon" supus analizei. În felul acesta, se înlătură şi o eventuală eroare în plus, care ar apare la operaţia de pipetare din decursul pregătirii probei standard (eventualitate ce dispare dacă ţintele de referinţă se pregătesc din însăşi soluţia de analizat).

Calcul : cantitatea de fier fixată de către siderofilină reprezintă capacitatea latentă de fixare a fierului şi se calculează potrivit formulei

$$\mu g\ Fe/100\ ml = \frac{imp./minut/ml \times \mu g\ Fe/ml\ sol.\ sat. \times 100}{imp._0/minut/ml}$$

în care :

imp./minut/ml = numărul de impulsuri pe minut pe ml ser de analizat, după îndepărtarea excesului de fier necomplexat

$imp._0$/minut/ml = număr de impulsuri pe minut pe ml soluţie de referinţă.

Dacă se adaugă la această cifră valoarea sideremiei, se obţine capacitatea totală de fixare a fierului de către siderofilină.

REZULTATE

În tabela 1 sînt prezentate rezultatele obținute prin determinarea radiocromatografică a siderofilinei din 20 de seruri provenite de la donatori de sînge apți pentru donare.

În fiecare ser a fost determinată sideremia, prin reacția de culoare cu ortofenantrolină (coloana 1) și au fost efectuate cîte 3 determinări paralele de siderofilină, media aritmetică a acestora luîndu-se ca valoare pentru serul respectiv (coloana 2). S-a calculat abaterea standard a celor 3 determinări (coloana 3) după formula

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

precum și coeficientul de variație (coloana 4).

$$C.V. = \frac{\sigma}{\bar{m}} \cdot$$

Tabela nr. 1

Determinarea radiocromatografică a siderofilinei în seruri normale (valori medii din 3 determinări)

Sideremie (μg /100 ml)	Siderofilina C.L. μg/100 ml			Sideremie + siderofilină C.L. (siderof. C. T.)
	Media	Abaterea medie pătratică	C. V.	
1	2	3	4	5
107	205	2,10	1,00	312
101	215	1,50	0,74	316
108	206	6,00	2,91	314
100	203	1,41	0,69	303
125	185	6,70	3,62	310
115	195	5,00	2,56	310
—	203	2,23	1,09	—
120	199	4,50	2,25	319
105	207	3,20	1,54	312
118	197	6,10	3,09	315
100	212	14,60	6,88	312
120	190	6,70	3,52	310
113	201	3,60	1,80	314
104	202	3,60	1,78	306
111	204	5,30	2,60	315
—	209	10,50	5,02	—
71	210	6,70	3,19	281
86	192	3,20	1,66	278
—	197	6,50	3,29	—
106	203	2,20	1,10	309
$m = 106,5\%$	$\bar{m} = 201,6$			$\bar{m} = 307,9$
$\sigma = 13,5$	$\sigma = 7,70$			$\sigma = 11,8$
C.V. = 12,70	C.V. = 3,85			C.V. = 3,80

Sub coloana a 1-a s-a trecut media sideremiilor, cu abaterea standard și coeficientul ei de variație, sub coloana a 2-a, media, abaterea standard și coeficientul de variație pentru cele 20 de medii ale capacității latente

a siderofilinei, corespunzătoare celor 20 de seruri, iar sub coloana a 5-a s-au trecut aceiaşi indici pentru capacitatea totală a siderofilinei.

Cele trei determinări paralele efectuate pe fiecare din cele 20 de seruri examinate au servit pentru aprecierea reproductibilităţii metodei. Coeficientul de variaţie al mediei determinărilor de siderofilină a oscilat între 0,75 şi 6,88%, ceea ce este cu totul satisfăcător pentru nevoile clinice.

Tabela nr. 2

Determinarea radiocromatografică a siderofilinei în seruri patologice (valori medii din 3 determinări)

Cazul	Diagnosticul	Sideremie (fig. la 100 ml)	Siderofilina C.L. (pag. la 100 ml)	Sideremie + siderofilină C.L. (siderofilină C.T.)
1	2	3	4	5
(M.St.)	Mielom	254	71	325
(Gr.V.)	Anemie hemolitică	179	154	333
(R.A.)	Anemie hemolitică	279	47	226
(P.E.)	Leucemie limfatică cronică	50	241	291
(M.I.)	Anemie hiposideremică	69	240	309

În tabela 2 sînt prezentate rezultatele obţinute pe 5 seruri patologice. Cele 3 seruri hipersideremice prezintă o scădere a capacităţii latente de saturare a siderofilinei; cele 2 seruri hiposideremice prezintă o creştere a siderofilinei libere.

Faptul că siderofilina totală din aceste seruri nu este crescută arată că este vorba de o hiposideremie fără hiposideroză generală, deci de o tulburare a metabolismului fierului, şi nu de o lipsă generală a acestui element.

Prezentată la redacţie la 10 noiembrie 1962

Laboratorul de biochimie şi izotopi radioactivi,
Centrul de hematologie,
Bucureşti

РАДИОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИДЕРОФЕРИНА НА ИОНООБМЕННЫХ ВЕЩЕСТВАХ И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОЗА

РЕЗЮМЕ

В работе описан вариант радиохроматографического метода для определения скрытой способности фиксации железа сидероферином. Статистический анализ результатов применения метода на 20 нормальных сыворотках показывает, что его воспроизводимость удовлетворительна для клинических надобностей.

DÉTERMINATION RADIOCHROMATOGRAPHIQUE SUR ÉCHANGEURS D'IONS DE LA SIDÉROPHILINE ET SON IMPORTANCE DIAGNOSTIQUE

RÉSUMÉ

On décrit une adaptation de la méthode radiochromatographique à la détermination de la capacité latente de fixation du fer par la sidérophiline. L'analyse statistique des résultats de l'application de cette méthode sur 20 sérums normaux démontre une reproductibilité satisfaisante pour les besoins de la clinique.

BIBLIOGRAFIE

1. BACIU I., Studii şi cercetări de medicină internă, *4*, 441 (1962).
2. BEALE R. N., BOSTROM J. O., TAYLOR R. F., J. Clin. Pathol., **14**, *5*, 488 (1961).
3. BOETTCHER E. W., KISTLER P., NITSCHMANN H., Nature, **181**, 490 (1958).
4. BLANC B., ISLIKER H., Bull. Soc. Chim. Biol., *7—8*, 929 (1961).
5. BOTHWELL T. H., JACOB P., KAMENER R., S. Afr. Med. Sci. , **24**, 93 (1959).
6. GITLOW S. E., BEYERS M. R., J. Lab. clin. Med., **40**, 541 (1952).
7. HENRY R. J., SOBEL CH., CHIAMORI N., Clin. Chim. Acta, **3**, 523 (1958).
8. JANDL H. J., J. Clin. Investig, **38**, *1*, 161 (1959).
9. KONITZER K., Zeitschr. f. fes. inn. Med., **17**, 801 (1955).
10. MICHIJASU A., ELMER B. B., J. Lab. clin. Med., **58**, *5*, 797 (1961).
11. POPESCU EM., *Fiziopatologia fierului. Anemiile hipocrome*, Bucureşti, Edit. Med., 1958.
12. RATH E. CH., FINCH A. C., J. Clin. Invest., **29**, *1*, 79 (1949).
13. SCHADE A. L., CAROLINE K., Science, **104**, 340 (1946).
14. SOLVELL L., Acta Med. Scand., **35** (supl.), 89 (1960).
15. SURGENOR D. M., KOECHLIN B., STRONG L. E., J. Clin. Invest., **28**, 73 (1941).
16. TAUXE-NEWLON W., A. J. Clin. Pathol., **36**, *5*, 403 (1961).

ELIMINAREA INDICANULUI ÎN EFORTUL FIZIC

I. ALEGEREA UNUI PROCEDEU DE DOZARE ADECVAT

DE

G. HARALAMBIE

În decursul cercetărilor noastre asupra eliminării de compuși indolici în urma unui efort fizic la om, am observat, evaluînd acești compuși prin reacția cu nitrit de sodiu în mediu fosforic [1], o creștere remarcabilă a concentrației lor și, adeseori, a vitezei lor de eliminare prin urină. Lucrările lui J. Král și colaboratori [2] [3], ca și unele fapte găsite de noi, par să arate că principalul cromogen răspunzător de acest fenomen ar fi acidul *3*-indolilacetic (prescurtat *3*-IAA) și, eventual, formele sale conjugate. Totuși și alți derivați ai triptofanului (nu numai acizii indolici strîns înrudiți cu *3*-IAA) ar putea interveni în reacție. Printre acești compuși se găsește indicanul, care dă cu nitritul, în mediu acid, o colorație capabilă de a influența valorile citirii fotometrice în condițiile noastre de lucru [4].

Ni s-a părut de aceea interesant să urmărim modificările indicanuriei în timpul diferitelor tipuri de efort fizic, cu atît mai mult cu cît acest indice ar putea furniza informații privind funcția renală [5], care uneori este serios influențată în urma lucrului muscular.

Prima problemă care se pune în această ocazie este alegerea unui procedeu adecvat de dozare a indicanului sau, mai degrabă, a compușilor indoxil- și scatoxil-sulfurici, care au fost puși în evidență cromatografic în urina umană.

Se știe că multe reacții colorate, considerate specifice unui anumit compus indolic, au fost ulterior regăsite la numeroși alți produși din aceeași familie. În aceste condiții, trebuie să se recurgă la separări care, efectuîndu-se prin procedee destul de laborioase, nu constituie metode de rutină ideale în clinică sau în medicina sportivă. De aceea, atenția noastră s-a îndreptat asupra cîtorva metode simple de dozare colorimetrică a indicanului. Lucrarea de față expune unele observații privitoare la specificitatea și eficacitatea acestor procedee de dozare a indicanului în urina normală și în probele recoltate după un efort fizic. Reamintim că în acest ultim caz este vorba adesea de o urină foarte concentrată (diureza sub 0,3 ml/minut, densitatea mai mare ca 1,030), conținînd metaboliți care

nu se găsesc decît în proporţii neînsemnate în urina normală. Aceste fapte impun verificarea unui procedeu de dozare „clasic" înaintea aplicării sale în cercetări pe sportivi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Reactivii întrebuinţaţi — cu grad de puritate analitic — aveau provenienţa următoare :
— acid clorhidric ($d = 1{,}19$) şi cloroform : „Merck" ;
— clorură ferică şi acetat de sodiu : „Reactivul" — Bucureşti ;
— acid fosforic 89% şi *p*-dimetilaminobenzaldehidă : „Austranal" ;
— timol şi serotonină : „Serva" — Heidelberg ;
— indol şi scatol : „B.D.H." ;
— acid *3*-indolilacetic : „Chinoin" — Budapest ;
— acid *3*-indolilbutiric : „Chemapol" — Praha ;
— Dowex-50 (× 2), 50—100 mesh (H^+) : „Dow Chem.Company".

Am studiat din unele puncte de vedere reacţiile de culoare ale lui : Jolles, în forma propusă de Eucker [6], Sharţit [7], Shivaram şi Mũting [14] şi cea a lui Marko şi Reynolds [8]. În acest din urmă caz, separarea prealabilă a cromogenilor se făcea în alt mod decît cel al autorilor citaţi, şi anume : 2 ml de urină se treceau printr-o coloană de Dowex în prealabil tratată cu 25 ml de soluţie 4% de KOH, apoi spălată cu apă distilată pînă la dispariţia practică a reacţiei alcaline (control cu hîrtie indicatoare Chemapol). După evacuarea forţată a urinei, coloana se elua direct cu 5 ml de soluţie 0,5% de amoniac, care se recupereau în acelaşi fel. Viteza de trecere : 2 ml/minut ; dimensiunile coloanei : 0,8 × 7 cm. Un ml de eluat era apoi tratat exact ca în procedeul original [8]. Coloana se regenera prin spălare cu KOH şi apă în felul descris mai sus. Coloana de Dowex trebuie spălată din timp în timp cu acid clorhidric.

Modul de lucru adoptat prezintă mai multe avantaje :

a) diluarea urinei de numai 1 : 2,5 ceea ce, ţinînd seama de sensibilitatea reacţiei de culoare, nu mai necesită o concentrare a eluatului ;

b) nici un fel de tratament cu acid sau la cald al probelor, ceea ce ar putea eventual distruge o parte din indoxilsulfat [9] ;

c) recuperare convenabilă a indicanului (vezi mai jos).

Procedeele lui Eucker, Shivaram şi Mũting şi Sharlit au fost utilizate fără modificări şi anume numai primele două cu titlu cantitativ, iar al treilea pentru verificări calitative.

Cromogenii indolici au fost apreciaţi cu ajutorul reacţiei cu nitrit de sodiu în mediu fosforic 30% [1] iar rezultatele sînt exprimate în μM *3*-IAA/ml ; citire la 530 mμ, faţă de probă martor fără nitrit.

Aparatură : fotometru Pulfrich şi extinctiometru fotoelectric Jurány-Kovács (rezoluţie circa 2 mμ, lărgimea benzii la 50% transmisie circa 12 mμ). Ultimul aparat a servit de asemenea la obţinerea spectrelor de absorbţie în domeniul vizibil.

Toate probele de urină au fost supuse analizei în cele trei ore ce urmau recoltării, fără a se adăuga vreun conservant ; am filtrat uneori urinile tulburi, însă nu am efectuat niciodată deproteinizarea lor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Procedeul lui Eucker [6]. Se ştia deja că, în condiţiile adoptate de acest autor, indolul şi *3*-IAA dau o coloraţie parazită [10], ce poate conduce la rezultate eronate ; încercările noastre ne-au arătat că efectul poate deveni

jenant începînd de la concentrații de 0,35—0,40 μM/ml de *3*-IAA. Asemenea valori pot fi întîlnite în urina subiecților normali în repaos [1] [3], în special vara, cînd diureza este mai redusă. Concentrațiile mari de *3*-IAA din urinile de efort (pînă la 1,2—1,8 μM/ml) pot determina erori grosolane la dozarea indicanului. Coloratia dată de *3*-IAA, extractibilă în cloroform, are un spectru de absorbție diferit de produsul obținut din indican; la urina conținînd mult *3*-IAA, spectrul de absorbție al extractului cloroformic diferă net de acela al urinei sărace în cromogeni indolici, ceea ce dovedește influența jenantă a prezenței acizilor indolici pentru dozarea indicanului (fig. 1).

S-a afirmat că excesul de clorură ferică are un efect destructiv asupra colorantului format în reacție [8]. Efectuînd extracția în cloroform la exact 30 de minute de la prepararea probelor de analiză (este de altfel timpul *minim* recomandat de autorul metodei), am obținut totuși, cu diverse cantități de urină luate în lucru, valori foarte apropiate între ele (tabela nr. 1), ceea ce n-ar fi fost de așteptat dacă afirmația menționată ar fi exactă. Aceasta nu exclude însă un efect negativ al clorurii ferice cînd extracția se efectuează la cîteva ore de la preparare și dacă, eventual, temperatura în camera de lucru este mai ridicată.

Procedeul lui Eucker prezintă avantajul de a putea fi aplicat direct urinii diluate 1 :2,5, fără alt tratament prealabil; de aceea l-am utilizat pentru verificarea separării pe Dowex a indicanului (vezi mai departe). Rezultatele dozării indicanului prin procedeul Eucker la subiecți normali, dimineața, în repaos, se găsesc în tabela nr. 2. Experimentele s-au efectuat în lunile februarie-aprilie.

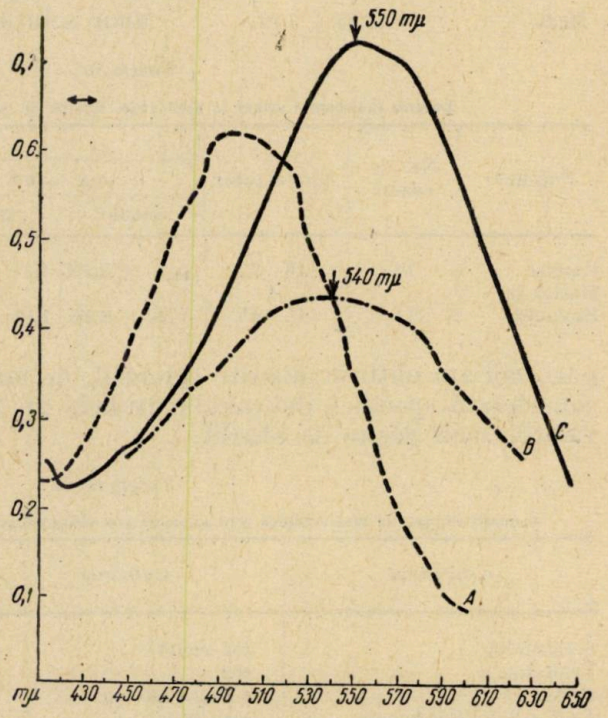


Fig. 1. — Spectrele de absorbție în domeniul vizibil al extractelor cloroformice (procedeul lui Eucker).

A: soluție de *3*-IAA pur;
B: urină bogată în *3*-IAA (0,58 μM/ml);
C: urină săracă în *3*-IAA (0,18 μM/ml);
Martor: cloroform.

Procedeul lui Sharlit [7]. Metoda utilizată de acest autor diferă de cea precedentă prin aceea că foloseşte drept oxidant persulfatul în locul clorurii ferice şi că separarea colorantului nu se mai face prin extracţie cloroformică, ci prin dizolvarea lui în tricloracetatul de etil care se formează treptat în sistem. Citirea rezultatelor se face la colorimetru, faţă de o soluţie etalon de sare de cobalt. Lucrînd în acest fel, Sharlit a obţinut valori foarte ridicate ale indicanuriei, de 36,8 pînă la 160 mg/24 de ore şi de 3,2 pînă la 16 mg %, cu valori medii de 82,7 mg/zi (deci 57,4 μg/minut) şi, respectiv, 8 mg%. Marko şi Reynolds [8] cred că este vorba de un procedeu superior celui al lui Eucker, în sensul că oxidantul nu mai distruge în acest caz colorantul format. Aplicînd însă această reacţie unor soluţii de diverşi compuşi indolici

Tabela nr. 1

Dozarea indicanului după Eucker, cu diverse cantităţi din aceeaşi probă diluată 1 :10

Urină	Indicanurie (mg% ml)
1 ml	10,24
1 ml	10,12
2 ml	10,23
3 ml	9,76
4 ml	10,29
Medie	10,13 ± 0,19

Tabela nr. 2

Dozarea indicanului urinar la două grupe diferite de subiecţi sănătoşi, în repaos

Pocedeul	Nr. de cazuri	Vîrsta (ani)	Indicanuria			
			mg % ml		μg/minut	
			medie	extreme	medie	extreme
Eucker	14	16–32	5,9 ± 2,18	1,1 – 9,31	35,9 ± 19,66	13,4 – 74,3
Marko şi Reynolds	14	15–45	5,26 ± 2,86	1,65 – 12,9	31,4 ± 13,43	12,5 – 52,7

puri, noi am obţinut diferite coloraţii, de unde reiese că ea nu poate fi considerată specifică indicanului (tabela nr. 3). Aceasta explică probabil valorile mari găsite de Sharlit.

Tabela nr. 3

Corelaţii obţinute în faza organică prin aplicarea procedeului Sharlit la soluţiile pure de compuşi indolici

Compusul	Culoarea	Intensitatea
Serotonină	roz-violet	foarte slabă
Triptofan	roz	slabă
3-IAA	λ max. 540 mμ	destul de intensă
Acid 3-indolilipropionic	roşu-brun	intensă
Scatol	purpuriu	foarte intensă
Indican	λ max. 540 mμ [11]	intensă

În 1942, Meikeljohn şi Cohen [11] au încercat să facă procedeul mai specific, prin citire la fotometru, cu martor, preparat în acelaşi fel, însă cu alcool pur în locul soluţiei de timol. Rezultatele obţinute de alţi autori

[12], care au aplicat această modificare a procedeului lui Sharlit, sînt remarcabil mai mici : la 15 subiecți de ambele sexe indicanuria era de 4,9 mg % (extreme : 1,3 și 10,2 mg %) sau de 49,5 mg/24 de ore (extreme : 15,4 și 77,4 mg/zi), adică de 34,4 μg/minut. Este adevărat că e vorba în cea mai mare parte de copii între 10 și 15 ani, ceea ce, în principiu, nu ar permite comparația cu cifrele date de alți autori, care au lucrat pe adulți. Mai trebuie să se țină seama de faptul că oxidarea indicanului în mediu acid, la cald, poate furniza un colorant chiar în absența timolului. În fine, remarcăm că spectrul de absorbție în domeniul vizibil al extractelor de urină preparate după Sharlit are o bandă puțin distinctă între 510—530 mμ, diferită de aceea a indicanului pur.

Procedeul lui Shivaram și Müting [14] este asemănător cu cele precedente, însă în acest caz nu se mai adaugă alt oxidant, ci se tratează proba, în prezența timolului, doar cu acid tricloracetic 25% în acid clorhidric concentrat. După 20 de minute de fierbere se îndepărtează faza apoasă, iar cea organică se aduce la volumul dorit cu alcool. Martorul se prepară în mod analog, însă fără timol.

O primă remarcă pe care am făcut-o aici este că, după diluarea finală cu alcool, tenta culorii se schimbă rapid și citirile fotometrice devin reproductibile abia după 5—7 minute. Am observat de asemenea că soluțiile de *3*-IAA pur, tratate după procedeul descris, dau o colorație mai intensă în absența timolului, decît în prezența acestuia ; ca atare, se putea presupune că, în urina bogată în *3*-IAA, dozările de indican după Shivaram și Müting ar da rezultate prea mici. Experimentele efectuate cu probe de urină la care am adăugat *3*-IAA au confirmat presupunerea de mai sus. Astfel, la o probă care dădea în mod normal o extincție de 0,315 pentru 1 cm de strat, la fotometrul Pulfrich cu filtrul S 53 (valoare reproductibilă în mai multe dozări), extincția a scăzut la 0,244 după prealabila adăugare de 1,37 μM/ml de *3*-IAA ; acest fenomen se datorește intensificării colorației soluției martor în ultimul caz. Deși nu am împins investigațiile mai departe, ni se pare că nici acest procedeu nu prezintă interes pentru dozarea indicanului la sportivi, în urma unui efort.

Trebuie să remarcăm că procedeele care neglijează influența prezenței *3*-IAA nu sînt adecvate nici în clinică, deoarece acest compus se formează în proporție mare alături de indican în putrefacțiile intestinale și într-o serie de alte afecțiuni ale aparatului digestiv, cum ar fi carcinomul gastric sau ulcerul gastric și duodenal [15] [16].

Procedeul Marko și Reynolds [8]. Acești autori s-au folosit de modificarea de culoare a produșilor rezultați din condensarea indolilor cu *p*-dimetilaminobenzaldehidă în mediu acid, în urma adăugării unei soluții 2 M de acetat de sodiu în alcool 50%. În aceste condiții, numai indicanul ar da o colorație roșie-cireșie. Printre compușii controlați de noi, indolul dă și el o colorație roșie, maxima fiind însă net diferită de aceea a indicanului (fig. 2 *A*). Toate celelalte substanțe din tabela nr. 3 nu dau nici o colorație care ar putea influența serios citirea la fotometru. Nici alte substanțe care reacționează cu *p*-dimetilaminobenzaldehida, ca ureea, acetona și acidul uric, nu dau la tratarea cu acetat de sodiu un viraj de culoare susceptibil de a jena dozarea indicanului în modul descris.

Coloraţia obţinută din urină poate fi extrasă în cloroform (o dată cu excesul de *p*-dimetilaminobenzaldehidă rămas); maxima de absorbţie scade în acest caz de la 520 mμ al soluţiei iniţiale la circa 505 mμ al extractului cloroformic (fig. 2 *B*). Am observat un fenomen asemănător la probele de urină sărace în indican; de aceea citirile s-au făcut totdeauna la 500 mμ.

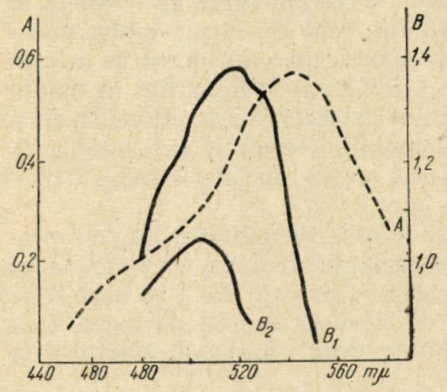


Fig. 2. — Spectrele de absorbţie ale soluţiilor tratate după Marko şi Reynolds.
A: indol;
B_1: urină bogată în indican;
B_2: extract cloroformic al coloraţiei obţinute cu altă urină;
Martor: reactivi, fără probe de analiză.

Reacţia nu poate fi efectuată direct pe urină [8]; de aceea, procedeul de separare descris mai sus a fost controlat dozînd indicanul în urină şi în eluatul coloanei de Dowex, prin procedeul Eucker. Rezultatele se găsesc în tabela nr. 4 şi arată că recuperarea e de peste 90%. Marko şi Reynolds au obţinut valori de la 81 la 100% cu indicanul pur, pe coloană de Dowex (K^+).

S-au făcut de asemenea dozări paralele în probe conţinînd cromogeni indolici în cantităţi variabile (tabela nr. 5). Rezultatele par să arate că o

Tabela nr. 4

Recuperarea indicanului din urină în primii 5 ml de eluat din coloana de separare (dozare prin procedeul Eucker)

Indicanul		Recuperare (%)
în urină (mg%)	în eluat (mg%)	
13,04	12,52	96
5,62	5,57	99,2
3,88	3,51	90,4
9,31	8,98	96,4
7,80	7,30	93,6
2,27	2,18	96

Tabela nr. 5

Dozarea paralelă a indicanului la un tînăr boxer, prin două procedee diferite

Condiţiile recoltării probei	Eucker direct (mg %)	Eucker în eluat (mg%)	Recuperare (%)	Cromogeni indolici μM/ml 3-IAA	Indican după Marko şi Reynolds (mg%)
În repaos	3,31	2,94	89	0,430	2,84
După efort	4,71	3,96	84	0,580	4,62
După 40 min	2,01	1,83	90,1	0,402	2,50

parte cel puțin a „indicanului" nerecuperat e în fapt constituită de colorația parazită pe care 3-IAA și acizii indolici înrudiți o dau în reacția lui Eucker.

Am găsit, în adevăr, cromogeni indolici prin reacția cu nitrit :

— în urina trecută prin coloană, doar uneori, urme ;

— în primii 5 ml de eluat, în special cînd concentrația lor inițială depășea 0,8 μM/ml ;

— în următorii 5 ml de eluat.

S-ar putea crede că nucleul indolic este reținut în coloana de Dowex (K^+), ca rezultat al afinității sale pentru grupele aromatice ale rășinii ; această legătură e foarte labilă, însă tăria ei variază fără îndoială și în funcție de structura lanțului lateral al compușilor respectivi. De aceea se poate obține o separare incompletă, însă destul de satisfăcătoare, a indicanului de acizii indolici, dintre care principalul este 3-IAA. Trebuie să menționăm că nu am găsit niciodată indican în probele de urină *după* trecerea lor prin coloana de Dowex.

Tabela nr. 6

Reproductibilitatea dozării indicanului după Marko și Reynolds cu separare pe Dowex

Eluatul	1	2	3	4	5	Media
Proba I	20,0	20,5	21,5	18,5	18,0	19,7 ± 1,29 μg/ml
Proba II	35,4	34,9	35,6	34,5	35,2	35,1 ± 0,4 μg/ml
Urina III *	26,7	27,2	27,0	25,2	—	26,5 ± 0,79 μg/ml

* Reacția colorată s-a efectuat direct pe urină de diverse diluții.

Rezultatele determinării indicanuriei la un număr de subiecți sănătoși, în repaos, au fost date în tabela nr. 2. Experimentele s-au efectuat în lunile iunie—august.

Reproductibilitatea valorilor, în modul de lucru adoptat de noi cu procedeul Marko și Reynolds, este remarcabilă (tabela nr. 6).

CONCLUZII

Din cele cîteva observații făcute asupra a patru procedee de dozare a indicanului urinar [6] [7] [8] [14] reiese că :

1. Procedeul lui Eucker nu este specific acestui compus și, mai mult, s-a afirmat că o parte din colorantul format s-ar distruge de către excesul de $FeCl_3$ din sistem. Aceasta poate da erori în plus și în minus, practic incontrolabile și, ca atare, inacceptabile la dozarea indicanului în scopuri de cercetare. Erorile în plus sînt în special importante cînd concentrația 3-IAA (sau, mai exact, a acizilor indolici) din urină este ridicată, cum se întîmplă la urinile emise după eforturi fizice.

2. Procedeul lui Sharlit dă valori prea mari, deoarece nu este specific indicanului. Modificarea propusă de Meikeljohn și Cohen [11] este poate mai avantajoasă, însă ar necesita unele verificări.

3. Procedeul Shivaram și Müting dă, în prezența 3-IAA, valori prea mici, din cauza comportării diferite a acestui compus în proba de lucru și în proba martor, respectiv în prezența și în absența timolului.

4. Procedeul lui Marko și Reynolds este nu numai mult mai specific, ci de asemenea bine reproductibil, fie că e vorba de o separare prealabilă pe cărbune dezactivat [8], fie pe Dowex, în condițiile descrise.

Această metodă este în același timp foarte comodă și constituie pentru moment, după părerea noastră, procedeul cel mai adecvat de dozare a indicanului urinar, inclusiv în cercetările la sportivi.

5. Valorile obținute de noi la subiecți de sex masculin, normali, dimineața în repaos (tabelul nr. 2), cu toate că nu pot fi în principiu comparate cu cele ale autorilor care au lucrat cu urine din 24 de ore, se apropie destul de bine de cifrele date de Feldheim [13] și Bessmann [12]. Reamintim că este vorba de analize în care vîrsta, sexul, climatul, anotimpul și tipul de alimentație al subiecților diferă la fiecare din lucrările citate în acest articol.

6. Procedeul lui Marko și Reynolds — puțin modificat în ce privește tratarea prealabilă a probelor — a fost aplicat în cadrul cercetărilor privind influența efortului fizic asupra eliminării indicanului. Rezultatele vor fi publicate într-o altă lucrare.

Prezentată la redacție la 11 septembrie 1962

Laboratorul de biochimie al Centrului de antrenament, cercetări științifice și medicină sportivă „23 August", București

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИКАНА ПРИ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

I. ВЫБОР ПОДХОДЯЩЕГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

С целью проследить за изменениями индиканурии при физической нагрузке, были изучены с некоторых точек зрения 4 метода калориметрического определения индикана, для выяснения наиболее подходящего из них.

Методы Эйккера, Шарлита и Шиварама и Мютинга не достаточно специфичны и дают ошибочные значения, в особенности в присутствии больших количеств 3-индолилуксусной кислоты, часто встречающейся в моче, под влиянием физической нагрузки.

Метод Марко и Рейнольдса, с предварительным разделением хромогенов на йонобменных веществах, дает, по-видимому, правильные результаты; ввиду того, что на данный метод практически не влияют некоторые факторы, вызывающие значительные погрешности при пользовании других указанных методов, метод Марко и Рейнольдса является наиболее подходящим при определении индикана в моче при физической нагрузке.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Спектры поглощения в видимой части спектра хлороформных экстрактов (метод Эйккера)

А — раствор чистой 3-индолилуксусной кислоты (3—ИУК);

В — моча, содержащая большое количество 3-ИУК (0,58 моль/мл);

С — моча, содержащая малое количество 3-ИУК (0,18 μ моль/мл).

Контроль: хлороформ.

Рис. 2. — Спектры поглощения растворов, обработанных по методу Марко и Рейнольдса

А — индол;

B_1 — моча, содержащая большое количество индикана;

B_2 — хлороформный экстракт окраски, полученной с другой мочой.

Контроль: реактивы, без анализируемой пробы.

L'ÉLIMINATION DE L'INDICANE PENDANT L'EFFORT PHYSIQUE.

I. CHOIX D'UN PROCÉDÉ DE DOSAGE ADÉQUAT

RÉSUMÉ

Dans le but de rechercher les modifications de l'indicanurie pendant l'effort physique, on a d'abord étudié à certains points de vue quatre méthodes de dosage colorimétrique de l'indicane, afin de préciser le procédé de travail le plus adéquat.

Les procédés d'Eucker, de Sharlit et celui de Shivaram et Müting ne sont pas assez spécifiques et donnent des résultats erronés, surtout en présence d'une proportion plus importante d'acide *3*-indolylacétique, ce qui se recontre souvent dans les urines d'effort.

La méthode de Marko et Reynolds, avec séparation préalable des chromogènes sur échangeur d'ions, paraît donner les résultats les plus corrects; n'étant pratiquement pas influencée par certains facteurs qui déterminent des erreurs importants si l'on emploie les autres procédés, cette dernière méthode est la plus indiquée pour le dosage de l'indicane dans les urines d'effort.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Spectres d'absorption dans le domaine visible des extraits au chloroforme (procédé d'Eucker)

A : Solution de *3*-IAA pur ;

B : urine riche en *3*-IAA (0,58 μmol/ml) ;

C : urine pauvre en *3*-IAA (0,18 μmol/ml).

Témoin: chloroforme.

Fig. 2. — Spectres d'absorption des solutions traitées par la méthode de Marko et Reynolds.

A : indole ;

B_1 : urine riche en indicane ;

B_2 : extrait au chloroforme de la coloration obtenue dans une autre urine.

Témoin : les réactifs sans épreuves d'analyse.

BIBLIOGRAFIE

1. G. HARALAMBIE, Studii şi cercetări de biochimie, **5**, 77 (1962).
2. J. KRÀL, A. ZENISEK, I. STOLZ, Biochim. Biophys. Acta, **19**, 169 (1956).
3. J. KRÀL, L. SCHMID, A. ZENISEK, I. STOLZ, Med. Welt, *31*, 1595 (1960).
4. E. BOYLAND, P. SIMS, D. WILLIAMS, Biochem. J., **62**, 546 (1956).
5. M. BÜRGER, *Pathologische Physiologie*, Leipzig, 1958, p. 701
6. H. EUCKER, Z. ges. exper. Med., **102**, 589 (1938).
7. H. SHARLIT, J. Biol. Chem., **99**, 537 (1932/1933).
8. A. MARKO, F. REYNOLDS, Canad. J. Biochem. Physiol., **38**, 253 (1960).
9. J. LARSSON, Ärztl. Forsch., **8**, 327 (1954).
10. F. FRANZEN, M. BREMER, Ärztl. Wochschr., **7**, 1107 (1952).
11. A. MEIKELJOHN, F. COHEN, J. Labor. Clin. Med., **27**, 949 (1942).
12. S. BESSMAN, K. TADA, Metabolism, **9**, 377 (1960).
13. W. FELDHEIM, Pharmazie, **12**, 82 (1957).
14. K. SHIVARAM, D. MÜTING, Ärztl. Forsch., **15**, 337 (1961).
15. M. WEISS Z. Krebsforsch., *56*, 343 (1949).
16. R. DONALDSON, H. DOLCINI, S. GRAY, Amer. J. Physiol., **200**, 794 (1961).

O METODĂ CROMATOGRAFICĂ PENTRU DOZAREA EPICORTIZOLULUI

DE

D. ONEȘANU

Epicortizolul (*4*-pregnen-*11*α, *17*α, *21*-triol-*3*,*20*-diona) este un intermediar în sinteza cortizonului și se obține de obicei prin hidroxilarea în poziția *11*α, cu diferite microorganisme, a substanței S Reichstein.

Pentru urmărirea procesului de hidroxilare este necesară o metodă rapidă de dozare a epicortizolului, pe măsură ce acesta se formează în mediul de cultură.

Majoritatea metodelor citate de literatură sînt metode cromatografice [3], care permit determinarea calitativă și cantitativă a epicortizolului, însă necesită un timp îndelungat (7—8 ore), ceea ce le face nepractice pentru urmărirea unui proces de oxidare pe cale fermentativă.

Metoda de față este tot o metodă cromatografică, însă se poate executa în decurs de aproximativ 2 ore.

Metoda de lucru este următoarea: din mediul fermentat cu *Absidia repens* (care oxidează substanța S Reichstein specific, în poziția *11*α) [2], se iau 50 ml și se extrag, prin agitare într-o pîlnie de separare, de două ori cu cîte 50 ml acetat de etil. Extractele se unesc și se spală cu 10 ml soluție 2% $NaHCO_3$ și apoi cu 10 ml apă distilată. Se usucă extractul prin agitare cu 5 g Na_2SO_4 sicc., se filtrează și se aduce la 100 ml, într-un balon cotat, cu acetat de etil.

În acest mod se realizează o extracție practic cantitativă a epicortizolului din mediul fermentat. Eficacitatea metodei de extracție a fost verificată pînă la concentrații de 1 000 μg steroid/ml mediu fermentat.

Pentru cromatografiere se folosește hîrtie Whatman nr. 1. Se aplică pe hîrtie, cu o micropipetă, o cantitate din extractul de acetat de etil corespunzătoare unui conținut de 50—200 μg epicortizol. Se aplică de asemenea martori de soluție de epicortizol etalon, în metanol. Soluția etalon, păstrată la rece, este stabilă în timp.

Se efectuează cromatografierea în sistem descendent, folosindu-se ca solvent pentru developare formamidă apoasă.

Solventul se prepară prin amestecarea a 1 volum formamidă „procromatographia" cu 9 volume apă. Solventul este stabil în timp la temperatura camerei.

Saturarea atmosferei din vasul cromatografic se face cu vapori de apă, prin adăugare de puțină apă pe fundul vasului.

Spre deosebire de majoritatea sistemelor descrise în literatură, în acest caz nu este necesară echilibrarea prealabilă a cromatogramei, începîndus-se imediat developarea. După 30 min, frontul de solvent înaintează cu 15—17 cm față de linia de start. Deoarece în acest sistem epicortizolul migrează cu $R_f = 0{,}76$, iar substanța S Reichstein rămîne pe linia de start, se realizează pe această distanță o separare suficient de bună ca să permită dozarea epicortizolului.

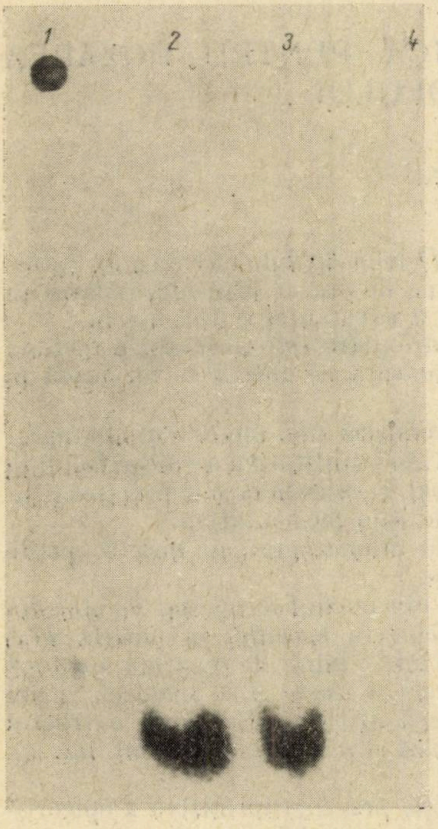


Fig. 1. — Cromatogramă după stropire cu reactiv Folin-Ciocîlteu și uscare.

1—Substanță S Reichstein. *2*—Epicortizol. *3*—Extract dintr-un mediu fermentat cu *Absidia repens*. *4*—Cortizol. La probele *1*, *2* și *4* s-au aplicat cîte 50 μg steroid etalon.

Cromatograma se scoate, se usucă la 100°C (5—10 min) și se stropește cu reactiv Folin-Ciocîlteu nediluat. Reactivul Folin-Ciocîlteu se prepară conform indicațiilor din literatură [1].

După stropire, cromatograma se usucă prin încălzire la 100°C timp de 10—12 min la întuneric, în care timp are loc și reacția de culoare pe care epicortizolul o dă cu reactivul Folin-Ciocîlteu. Se decupează petele albastre date de epicortizol și se eluează cu cîte 6 ml apă distilată. Se formează o colorație verde, ca rezultat al suprapunerii colorației albastre obținute, cu culoarea galbenă a reactivului în exces. Pentru distrugerea excesului de reactiv se adaugă cîte 1 ml soluție N/1 NaOH. Se obține o colorație albastră, ce se fotometrează la 660 mμ față de un martor de hîrtie din aceeași cromatogramă, prelucrată în mod similar. Se trasează diagrama etalon cu ajutorul martorilor de epicortizol, aplicați în cantități bine determinate și din diagramă se află cantitatea de epicortizol luată în lucru.

Se precizează că diagrama etalon trebuie trasată pentru fiecare cromatogramă în parte.

Citirea probelor nu trebuie făcută mai tîrziu de 2 ore după adăugarea soluției de NaOH, deoarece colorația obținută nu este stabilă în timp.

Cantităţile maxime de epicortizol ce au fost separate şi dozate în bune condiţii cu ajutorul acestei metode au fost pînă la 250 μg.

Reactivul Folin-Ciocîlteu permite detectarea unor cantităţi de 5 μg epicortizol, însă domeniul optim pentru dozare este de 25—250 μg.

Deoarece reactivul Folin-Ciocîlteu este fotosensibil, cromatogramele uscate trebuie ferite de lumină.

Cortizolul, care poate apare în cursul acestui proces de hidroxilare ca produs secundar, migrează în sistemul folosit cu aceeaşi valoare R_f, ca şi epicortizolul. El nu modifică totuşi, practic, rezultatele dozărilor, deoarece se formează în cantităţi mici (circa 8% faţă de epicortizol) [2], iar în condiţiile de lucru descrise intensitatea coloraţiei pe care o produce este de aproximativ 8 ori mai mică decît intensitatea coloraţiei produse de epicortizol.

Rezultatele dozărilor obţinute prin metoda arătată au fost comparate cu dozările efectuate printr-o metodă descrisă în literatură [2] şi s-a constatat că ele sînt concordante.

Metoda cromatografică prezentată este o metodă rapidă şi specifică de dozare a epicortizolului, ce permite o bună urmărire în timp a procesului de oxidare a substanţei S Reichstein la epicortizol cu ajutorul microorganismelor.

Prezentată la redacţie la 29 decembrie 1962

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Secţia biosinteze

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИКОРТИЗОЛА

РЕЗЮМЕ

В работе представляется хроматографический метод определения эпикортизола (*4*-прегнен-*11* α, *17* α, *21*-триол-*3,20*-диона). Для проявления хроматограммы пользовались растворителем формамид-вода (1 : 9). Нет необходимости предварительно уравновешивать хроматограмму в атмосфере хроматографического сосуда. После проявления (около 30 мин.) хроматограмму высушивают, смачивают неразбавленным реактивом Фолин-Чокылтеу и высушивают в течение 10—12 мин. при 100°С.- Синие пятна, появившиеся под действием эпикортизола, элюируют 6 мл дистиллированной воды каждое. Затем добавляют 1 мл раствора NaOH 1 н. и фотометрируют при 660 μм. Содержание эпикортизола в пробе находят пользуясь диаграммой, полученной при помощи контрольных стандартных растворов эпикортизола, для каждой хроматограммы. Продолжительность определения 2 часа. Наилучшая область для отделения и определения 25—250 μг эпикортизола. Метод применяли для сред, ферментированных Absidia repens. Эпикортизол экстрагировали ацетатом этила.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Хроматограмма после смачивания реактивом Фолин-Чокылтеу и сушки. *1* — вещество S. Reichstein; *2* — эпикортизол; *3* — экстракт среды, ферментированной Absidia repens; *4* — кортизол, в пробах 1, 2 и 4 добавляли по 50 μг стандартного раствора.

MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE POUR LE DOSAGE DE L'ÉPICORTISOLE

RÉSUMÉ

On décrit une méthode chromatographique pour le dosage de l'épicortisole (le *4*-pregnen-*11α*, *17α*, *21*-triole-*3*,*20*-dione). Pour développer le chromatogramme on utilise un mélange de formamide-eau (1 : 9). Il n'est pas nécessaire d'équilibrer au préalable le chromatogramme à l'atmosphère du récipient chromatographique. Après développement (approximativement 30 min) on sèche le chromatogramme, on l'arrose au réactif Folin-Ciocîlteu non dilué et on le sèche pendant 10—12 min à 100°C. On découpe les zones bleuies par l'épicortisole et on les élue avec des portions de 6 ml d'eau distillée. On les additionne chacune d'un ml de solution N/1 de NaOH et on les évalue au photomètre à 660 μμ. On détermine la teneur en épicortisole par l'emploi d'un diagramme tracé à l'aide de témoins-étalons d'épicortisole pour chaque chromatogramme. Durée de la détermination : 2 heures. Domaine optimum pour la séparation et le dosage : 25—250 μg épicortisole. La méthode a été appliquée à des milieux fermentés à l'*Absidia repens*. L'épicortisole a été extraite de ces milieux à l'acétate d'éthyle.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Chromatogramme après arrosage au réactif Folin-Ciocîlteu et séchage. *1* — Substance S. Reichstein. *2* — Epicortisole. *3* — Extrait d'un milieu fermenté à l'*Absidia repens*. *4* — Cortisole. Dans chacun des essais *1*, *2* et *4* on a appliqué 50 μg d'étalon.

BIBLIOGRAFIE

1. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, vol. III, p. 467, Academic Press, New York, 1957.
2. В. К. Ерошин, *Превращение вещества S Рейхштеина грибами Absidieae* Мед. Пром. СССР, **23**, *11* год (1962).
3. E. Lederer et al., *Chromatographie en chimie organique et biologique*, vol. II, p. 165, Masson et Cie., Paris, 1960.

DETERMINAREA ACIDULUI LACTIC ÎN NUTREȚUL DE PORUMB ÎNSILOZAT, PRIN METODA CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE

DE

M. SAFTA

Determinarea acidului lactic din nutreturile însilozate, prin metoda cromatografiei pe hîrtie, prezintă, în comparație cu alte procedee [1] [2] [3] avantajul simplității în execuție.

La baza evaluării acidului lactic prin metoda propusă stau metodele lui Reid și Lederer [4], ca și aceea a lui Duncan și Porteous [5], adaptate la studiul nutreturilor însilozate de către Birk și Bondi [6].

MATERIAL ȘI METODĂ

1. Solventul pentru developare : *n*-butanol saturat cu un volum egal de amoniac 1,5 N.

2. Indicatorul : soluție 0,08% roșu de metil și 0,08% albastru de bromtimol (g/v) dizolvate într-un amestec de formalină în etanol p.a. (1 : 5 v/v). Soluția astfel preparată se aduce la pH 5,2 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu 0,1 N.

3. Soluție etalon de acid lactic : se prepară soluții apoase cu concentrațiile de 0,125, 0,175, 0,25, 0,375, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 și 1,75 %, ajustîndu-se valoarea pH-ului la 8,0 cu amoniac 1,5 N, folosind hîrtie indicatoare universală.

4. Fîșii de hîrtie Whatman nr. 2 cu dimensiunile 33/3,5 cm : la 3 cm de capătul hîrtiei se conturează cu creionul, foarte palid, cu ajutorul unui model de celuloid, forma petei care se va picura. Dimensiunile ovoidului sînt 6/9 mm, cu dimensiunea mare orientată în sensul fibrelor. Se notează și centrul ovoidului. Hîrtiile astfel pregătite sînt gata de lucru.

5. Placă de celuloid cu un orificiu de 6/9 mm, efectuat prin comparare cu forma ce o ia picătura la depunerea pe hîrtia Whatman.

6. Dispozitiv de developare Chropa, cu înălțimea adecvată hîrtiilor mai sus menționate, care se umple la exterior cu faza apoasă, iar cu faza organică în cuvă, cu 24 de ore înainte de începerea analizei.

7. Uscător obișnuit cu aer rece.

8. Micropipetă de 10 μl.

9. Suport din lemn pentru uscarea cromatogramelor.

10. Pulverizator Chropa sau pulverizator de parfum.

Prepararea extractului de nutreț însilozat. Se cîntăresc 250 g nutreț într-un vas de 1,5 l, adăugîndu-se 750 ml apă distilată și cîteva picături de toluen. Conținutul se păstrează peste noapte la temperatura camerei și se filtrează, storcîndu-se bine materialul. O parte din filtrat se ajustează la pH 8 cu amoniac 1,5 N în prezența indicatorului universal. Se separă de precipitat prin filtrare pe hîrtie cutată cantitativă, într-un vas corespunzător.

Depunerea spoturilor. Se depun 10 μl extract de siloz sau soluție etalon în porțiuni de cîte 3,33 μl exact în centrul conturului hîrtiei, după fiecare depunere uscîndu-se în curent de aer rece, astfel ca mărirea spotului depus să coincidă cu conturul marcat în prealabil.

Developarea spoturilor. S-au depus spoturi pe cîte 2—3 hîrtii pentru o singură probă, după care au fost păstrate timp de 15 ore la temperatura camerei, pentru îndepărtarea totală a sărurilor de amoniu ale acizilor volatili (acidul acetic posedă valoarea R_f identică cu acidul lactic). Hîrtiile au fost apoi introduse în vasul Chropa, scufundate în *n*-butanol, unde s-au lăsat pînă cînd solventul atingea vîrful hîrtiei (circa 15 ore la 20°C).

Uscarea, stropirea și revelarea spoturilor. Se îndepărtează hîrtiile din vasul Chropa, atîrnîndu-se pentru uscare pe suportul din lemn, la temperatura camerei. Hîrtia uscată se pulverizează bine cu soluția indicatoare pe toată lățimea și pe o înălțime de 10 cm de la linia de start, pînă cînd pe porțiunea stropită se observă luciul soluției de pulverizare.

Hîrtia se introduce imediat într-un borcan (33/22 cm) în care s-au turnat 100 ml amoniac 3% (v/v). Hîrtiile se expun la acțiunea vaporilor de amoniac de cinci ori timp de cîte 5 secunde, la intervale de 30 de secunde. Spotul roșu, care apare din fondul verde după ultima expunere, se conturează cu un creion. Se determină suprafața prin copiere pe hîrtie milimetrică de calc.

Pentru demonstrarea eficienței metodei propuse, datele analizei cromatografice au fost comparate cu acelea indicate de metoda distilării [1]. Pentru aceasta s-a utilizat nutrețul de porumb însilozat de la Stațiunea experimentală Șimnicu. Rezultatele sînt expuse în tabela nr. 1, ele fiind raportate la substanța umedă.

Din tabela nr. 1 se observă paralelismul bun care există între cele două metode.

Tabela nr. 1

Datele analizei nutrețului de porumb însilozat la Stațiunea experimentală Șimnicu în 1962

Data recoltării (1962)	Aciditate titrabilă (% acid lactic)	pH	Acid acetic liber (%)	Metoda distilării		Metoda cromatografică (acid lactic %)
				acid butiric liber (%)	acid lactic liber (%)	
18.I	1,80	3,85	0,63	—	0,85	0,98
23.I	1,70	3,80	0,67	—	0,71	0,84
28.I	1,71	3,80	0,57	—	0,85	—
8.II	1,71	3,80	0,61	—	0,80	0,94
10.III	1,75	3,80	0,55	—	0,85	0,96
11.IV	1,75	3,85	0,35	0,20	0,80	0,93
25.IV	1,70	3,80	0,55	—	0,89	1,04
17.V	1,90	3,65	0,38	—	1,04	1,21
16.VI	1,65	3,85	0,50	0,10	0,80	1,01

Proporționalitatea care există între conținutul în acid lactic și suprafețele petelor după developare, este expusă în tabela nr. 2.

Din datele acesteia s-a determinat acidul lactic din nutrețurile însilozate.

Tabela nr. 2

Concentrațiile în acid lactic, suprafețele și erorile medii

Nr. spoturilor aplicate	Acid lactic		Suprafața medie (mm^2)	Eroarea medie	
	mm^2	%		mm^2	(%)
3					
2	0,125	12,55	88	± 1,9	2,2
3	0,175	17,5	120	± 5,0	4,1
2	0,25	25,0	146	± 0,9	0,9
3	0,375	37,5	236	±10,0	4,2
2	0,5	50	286	± 1,09	0,7
3	0,75	75	330	± 5,0	1,5
2	1,0	100	366	±10	2,7
3	1,25	125	410	± 2,0	0,5
2	1,50	150	438	± 5,0	1,2
	1,75	175	490	±10	2,0

Metoda descrisă poate servi și la determinarea acizilor volatili. În acest caz nu mai este necesară aerisirea prealabilă a cromatogramelor ce conțin spoturile depuse. Valorile R_f ale acizilor propionic și butiric sînt diferite față de acelea ale acizilor lactic și acetic (care interferă).

CONCLUZII

Deoarece între metoda distilării și metoda cromatografiei pe hîrtie există un paralelism, aceasta poate fi aplicată la evaluarea cantitativă a acidului lactic din nutrețul însilozat de porumb.

Prezentată la redacție la 3 decembrie 1962

Catedra de chimie organică și biologică,
Institutul agronomic
„Tudor Vladimirescu", Craiova

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В СИЛОСОВАННОМ КУКУРУЗНОМ КОРМЕ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

РЕЗЮМЕ

Было констатировано, что существует параллелизм между методом дистилляции и методом хроматографии на бумаге. Это было использовано автором, применившим метод хроматографии на бумаге, для количественного определения молочной кислоты в силосованном кукурузном корме.

DÉTERMINATION CHROMATOGRAPHIQUE SUR PAPIER DE L'ACIDE LACTIQUE DANS LE MAÏS ENSILÉ

RÉSUMÉ

On a constaté un parallélisme entre la méthode de la distillation et la chromatographie sur papier, ce qui a permis à l'auteur d'appliquer la méthode chromatographique sur papier pour l'évaluation quantitative de l'acide lactique du maïs fourrager ensilé.

BIBLIOGRAFIE

1. I. F. KÜCHLER, *Arbeitsmethode zur Untersuchung und Beurteilung von Silofutter*, Arch. f. Pflanzenbau, **44**, 607 (1931).
2. A. J. G. BARNETT, Biochem. J., **49**, 527 (1951).
3. A. T. JAMES, A. I. P. MARTIN, Biochem. J., **50**, 679 (1952).
4. R. L. REID, M. LEDERER, Biochem. J., **50**, 60 (1951).
5. R. E. B. DUNCAN, J. V. PORTEOUS, The Analyst, **78**, 641 (1953).
6. Y. BIRK, A. BONDI, The Analyst, **80**, 454 (1955).

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1562. VOICULESCU M., *Indicații și rezultate ale terapiei cu hormoni corticoizi în bolile infecțioase*, Studii și cercet. inframicrobiol., 1962., **XIII**, *5*, 635—647.

Referat general cu 36 de indicații bibliografice.

D. Tănăsescu

1563. PĂUN R., *Aportul și limitele electroforezei pe hîrtie în clinica medicală*, Studii și cercet. med. int., 1962, **III**, *2*, 167—187.

Referat general fără indicații bibliografice.

C. Iordache

1564. VELICAN C., *Biologia procesului de scleroză.* **VII.** *Metodă pentru studiul comparativ al componentelor fibrilare fucsinofile, argintofile, PAS-pozitive și substanței fundamentale*, Studii și cercet. med. int., 1962, **III** *2*, 275—278.

Se descrie o metodă care permite să se pună în evidență succesiv pe același cîmp microscopic. dinamica raporturilor cantitative, calitative și topografice ale procolagenului fucsinofil, a complexelor glucido-lipidice argintofile, a mucopolizaharidelor neutre, PAS-pozitive și metacromatice după sulfatare și a mucopolizaharidelor acide cu metacromazie spontană. Metoda constă în fotografierea acelorași cîmpuri microscopice colorate succesiv cu Van Gieson, albastru de toluidină, Gomori, PAS și albastru de toluidină după sulfatare.

C. Iordache

1565. POPESCU I. GR. şi OLINESCU R., *Prepararea alergenului din praf de casă*, Studii şi cercet. med. int., 1962. **III**, *3*, 403—406.

Se dă o nouă metodă de preparare a alergenelor de praf cu purificare mijlocie. S-a determinat conţinutul în azot, în polipeptide, în polizaharide. S-a constatat că efectele alergenului sînt asemănătoare cu acelea date de alergenii similari preparaţi în R.S. Cehoslovacă.

C. Iordache

1566. BACIU I., *Fracţiuni electroforetice biologic active în plasma sanguină*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *4*, 441—449.

Referat general cu 41 de indicaţii bibliografice.

C. Iordache

1567. BÎRSAN E. T., IONESCU C. I. şi POP L., *Dozarea rapidă a morfinei pe cale cromatografică*, Farmacia, 1961, 11, 665—668.

Se recomandă cromatografia circulară sau descendentă, folosind ca solvent amestecul de alcool etilic-cloroform-acid formic (10 : 1 : 0,5). Evidenţierea morfinei se face cu reactiv Pauly (modificat prin folosirea de alcool etilic).

S. Vasu

1568. MIHALCU F., *Colorarea imunofluorescentă*, Microbiol., parazitol., 1962, **VII**, *3*, 209—219.

Referat general cu 27 de indicaţii bibliografice.

D. Tănăsescu

1569. BONA C., *Asupra mecanismelor de acţiune a fixatorilor şi aplicaţiile tehnicilor de fixare în studiul histochimic al componentelor tisulare*, Microbiol., parazitol., 1962, **VII**, *4*, 313—323.

Referat general cu 67 de indicaţii bibliografice.

D. Tănăsescu

1570. FENYVES A., *Date recente cu privire la inactivarea prin formol a virusurilor*, Microbiol., parazitol., 1962, **VII**, *5*, 395—406.

Articol de sinteză, fără indicaţii bibliografice.

D. Tănăsescu

1571. MANOLESCU D., WASSERSTROM V., LASCU F., NICULESCU M. şi CUVIN E., *Cercetări asupra depistării precoce a tumorilor maligne oculare şi orbitare cu ajutorul fosforului radioactiv*, Oftalmol., 1962, *2*, 123—128.

Principiul metodei se bazează pe proprietatea izotopilor radioactivi introduşi în organism de a se fixa selectiv şi în cantităţi apreciabile în celulele tumorale bogat vascularizate şi active metabolic. Radiaţiile se detectează cu un contor Geiger-Müller. Se expun rezultatele obţinute, discutîndu-se eficacitatea diagnosticului şi descriindu-se perfecţionările aduse de autori acestei metode.

L. Arnet

1572. CIOBA GH., HERSCOVICI H. şi CAVULEA O., *Influenţa radiaţiilor ionizante asupra acizilor nucleici*, Oncol., radiol., 1962, **I**, *4*, 377—383.

Referat general cu 26 de indicaţii bibliografice. Cuprinde următoarele capitole : 1) Importanţa biologică a acizilor nucleici. 2) Acţiunea radiaţiilor ionizante asupra acizilor nucleici. 3) Rolul acizilor nucleici în boala de iradiaţie. Autorii intercalează şi date personale privind protecţia iepurilor iradiaţi, trataţi cu măduvă omologă şi acid dezoxiribonucleic.

M. Furnică

1573. KIFOR I., ZAKARIÁS M. şi VÁRODI K., *Procedeu simplu pentru punerea în evidenţă a acidului ascorbic în urină*, Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *3*, 316—317.

La circa 5 ml urină (acidă), proaspăt recoltată, se adaugă aprox. 0,05 g de indicator (0,1 g diclorfenol-indofenol +90 g NaCl+10 g hidrofosfat disodic ; amestecul este stabil cîteva luni de zile la întuneric) ; culoarea albastră a amestecului, după 15 sec, indică absenţa acidului ascorbic. Sînt date rezultatele obţinute pe un număr de 1 373 de probe provenite de la 1 000 bolnavi cu diferite afecţiuni (tuberculoză, diabet, gastrită, nefrită, hipertensiune arterială etc.), propunîndu-se folosirea testului de mai sus în legătură cu necesitatea administrării de vitamină C.

S. Vasu

1574. CSONTOS A., *Determinarea proteinelor serice prin titrare cu permanganat de potasiu*, Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *4*, 434—435.

Se descrie o metodă simplă de determinare a proteinelor serice totale, a albuminei şi fibrinogenului prin titrare cu permanganat de potasiu, bazîndu-se pe faptul că proteinele precipitate (cu acid tricloracetic pentru proteinele totale, cu $(NH_4)_2SO_4$ soluţie semisaturată pentru albumine şi cu clorat de calciu pentru fibrinogen) redizolvate cu alcalii reduc (decolorează) la rece în mediu acid permanganatul de potasiu. Compararea rezultatelor astfel obţinute cu alte metode, a condus la următoarele date : ±0,30 g% faţă de kjeldahlizare ; ±0,60 g % faţă de determinări refractometrice ; practic fără diferenţe faţă de metoda Foster-Whipple pentru determinarea fibrinogenului.

S. Vasu

1575. VERÉPH I. şi FÜLÖP L., *Determinarea complexometrică a hexafosfatului*, Rev. med., Tg. Mureş, 1962, *2*, 197—200.

Metoda propusă constă în precipitarea acidului inozitfosforic cu un exces de $CuSO_4$ care este apoi tritat cu complexon III, în mediu acid în prezenţă de *1*-(*2*-piridilazo)*2*-naftol (PAN). După alcalinizarea aceluiaşi amestec, se determină conţinutul în Ca şi Mg folosind complexon III şi indicatorul de mai sus. În felul acesta, în analiza hexafosfatului pe lîngă conţinutul în fosfor, se dă şi cel de Ca şi Mg, care nu este indiferent, ţinînd seama de faptul că acest medicament este folosit şi în calciu-terapie.

S. Vasu

1576. USCHERSOHN H., *Unele probleme teoretice ale geneticii (cu privire la rolul acizilor nucleici)*, Viaţa med., 1962, **IX**, *15*, 817—826.

Se privesc în mod critic datele actuale în acest domeniu şi se pun în evidenţă principalele necunoscute către a căror rezolvare trebuie să se îndrepte cercetările pentru a se ajunge la înţelegerea deplină, ştiinţifică, a procesului eredităţii.

D. Moţet-Grigoraş

1577. MIŢKEVICI M. S., *Corelaţiile hormonale dintre mamă şi făt la mamifer*, An. rom.-sov., biol., 1962, *4*, 46—56.

Referat general cu 59 de indicaţii bibliografice.

L. Arnet

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

V. ENZIME

VI. VITAMINE. HORMONI. ALȚI COMPUȘI BIOACTIVI

1578. VAISLER L., ANTONESCU C., COSTINER E. și ANTONESCU N., *Influența vitaminei B_{12} asupra biosintezei hormonilor tiroidieni*, Studii și cercet. endocrinol., 1962, *2*, 211—215.

S-a administrat, la șobolani albi, timp de 21 de zile, vitamină B_{12} în doză zilnică de 100 mg. Înainte de sacrificare, animalelor li se injecta ^{131}I intraperitoneal. S-a făcut cromatografia tiroidelor. Se conchide că vitamina B_{12} produce o inhibiție a captării radioiodului de către tiroidă și o oprire a procesului de transformare a tirozinelor în tironine.

D. Cotariu

1579. MILCU I., DAMIAN E. și IONESCU M., *Date în legătură cu extracția din urină a substanței antiandrogene a epifizei*, Studii și cercet. endocrinol., 1962, *2*, 217—223.

Substanța antiandrogenă din urina de copil se poate extrage cu mijloacele utilizate pentru gonadotropi (precipitare alcoolică, extracție cu tanin, adsorbție pe acid benzoic sau pe caolin). Controlul biologic a fost făcut pe iepuri cu ajutorul testului *17*-cetosteroizilor urinari și al respirației testiculare *in vitro* și a arătat că substanța este activă, cu diferențe în ceea ce privește intensitatea și semnificația. Se mai discută problema specificității acțiunii antiandrogene și valoarea metodelor biologice de control.

D. Cotariu

1580. ȘERBAN AL. M. D., CHIVU V. și SĂHLEANU V., *Date asupra acțiunii gonadotropinei serice și corionice pe suprarenală*, Studii și cercet. endocrinol., 1962, *2*, 251—257.

S-a studiat, pe șobolancă castrată, acțiunea gonadotropinelor serice și corionice asupra suprarenalei, comparativ cu acțiunea ACTH-ului. Administrarea de gonadotropine corionice produce o scădere a conținutului în colesterol al suprarenalei și modificări histologice asemănătoare cu cele provocate prin administrare de ACTH, în timp ce injectarea de gonadotropine serice nu este urmată decît de scăderea conținutului în colesterol.

D. Cotariu

1581. VAISLER L. şi COSTINER E., *Un mod particular de reactivitate a ciinelui la doze diferite de triiodotironină*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 259—264.

S-a cercetat acţiunea diferitelor doze de *L-3* : *3'* : *5*-triiodotironină asupra secreţiei biliare şi frecvenţei pulsului la ciini cu fistulă cronică a colecistului şi legătura canalului coledoc, urmărindu-se în acelaşi timp semnele clinice ale apariţiei unei eventuale hipertiroidii experimentale. Se constată că reactivitatea ciinelui la triiodotironină este foarte scăzută în comparaţie cu aceea a altor animale.

D. Cotariu

1582. LUNGU AL., HOLBAN R. şi SĂHLEANU V., *Efectul calorigen al adrenalinei după epifizectomie*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 297—298.

La şobolan, epifizectomia este însoţită de o scădere a efectului calorigen declanşat de adrenalina exogenă. Datele obţinute ar indica şi participarea altor factori decît a celor tiroidieni, în realizarea influenţei pe care epifiza o manifestă asupra schimburilor gazoase la mamifere.

D. Cotariu

1583. VAISLER L. şi COSTINER E., *Acţiunea triiodotironinei la ciini cu ficat lezat*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 299—300.

Se cercetează posibilitatea instalării unei hipertiroidii experimentale la ciini cu ficat lezat prin CCl_4 şi după administrarea paralelă de triiodotironină. Se constată că secreţia biliară scade, pulsul faţă de martori variază (între $-7{,}2\%$ şi $+8{,}3\%$), greutatea rămîne staţionară, iar comportamentul nu trădează fenomene de hipertiroidie periferică. Se conchide că la ciini există un mod particular de răspuns la triiodotironină, în comparaţie cu alte animale.

D. Cotariu

1584. VAISLER L. şi COSTINER E., *Reactivitatea ciinelui la doze diferite de triiodotironină asociate cu tiroxină*. Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 300—301.

Tiroxina administrată la ciini în doză de 50 γ pe kg corp nu potenţează efectul dozelor crescinde de *L-3* : *3'* : *5*-triiodotironină. Se conchide că administrarea triiodotironinei nu produce nici un răspuns, la ciine.

D. Cotariu

1585. GHEORGHIU A., CONSTANTINESCU A. şi IONESCU-MATIU E., *Contribuţii la studiul unor principii activi din speciile de* Leucojum, *prin metoda electroforetică*, Rev. med., Tg. Mureş, 1962, *1*, 54—56.

Folosirea electroforezei bidimensionale în analiza unor extracte din *Leucojum vernum* L. şi *Leucojum activum* L., practicată în mediu de acid formic a permis autorilor separarea unui spot, iar în mediu alcalin a două spoturi net diferenţiate, care se colorează în roşu-cărămiziu tratînd electroforegramele cu reactiv Dragendorff modificat. Separarea celor două fracţiuni în cantităţi mai mari, prin folosirea electroforezei preparative, a permis obţinerea în stare pură a doi alcaloizi. Cercetarea unor proprietăţi fizico-chimice a acestor substanţe a indicat identitatea celor doi alcaloizi din speciile de *Leucojum*.

S. Vasu

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1586. STAVRI D. et MESROBEANU L., *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram-négatifs. III. Action des neurotoxines de* Typhimurium *"S" et „R" sur les leucocytes polynucléaires des cobayes*, Arch. roum. pathol. expér., 1962, **XXI**, *3*, 545—551.

Neurotoxinele „S" şi „R" au o acţiune letală *in vitro* asupra leucocitelor polinucleare. Determinarea cantităţii de formozan produs de dehidrogenazele leucocitare sub acţiunea neurotoxinelor a arătat că acţiunea letală este proporţională cu cantitatea de toxină utilizată.

D. Tănăsescu

1587. TOPCIU A. et POPESCU E., *Étude sur la hyaluronidase chez la* Neisseria meningitidis *et autres* Neisseria *(flavus, flavescens, crossus) ; relation entre la production d'enzyme et la pathogénité*, Arch. roum. pathol. expér., 1962, **XXI**, *3*, 619—623.

S-a studiat activitatea enzimatică (prin metoda Mc Clean) la 70 de tulpini. Numai 15,7% din tulpinile studiate produc enzima, însă 63,63% din cele hialuronidazo-pozitive sînt patogene pentru şoarecele alb.

D. Tănăsescu

1588. UJVÁRY I., ORLIK I., RACZ G. şi DONÁTH A., *Acţiunea fungistatică a extractului de fructe de merişor* (Vaccinium vitis idaea L.), Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *4*, 427—429.

Extractul de fructe de merişor inhibă dezvoltarea a numeroase ciuperci cu patogenitate umană, remarcîndu-se un deosebit efect asupra dermatofitonilor (*Mikrosporon andonini, M. ferrugineum, Trichophyton violaceum, T. rosaceum*).

S. Vasu

VIII. BIOCHIMIA PLANTELOR

1589. IONESCU G. *Modificări morfologice, fiziologice şi biochimice obţinute la varză* (Brassica capitata) *după administrare de foliculină şi tiroxină*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *3*, 421—427.

Se constată precocitate în formarea şi dezvoltarea căpăţînilor, modificări ale formei acesteia şi a culorii frunzelor, intensificarea respiraţiei şi creşterea conţinutului în acid ascorbic. Dozele mai slabe dau rezultate mai accentuate.

D. Cotariu

1590. CONSTANTINESCU E., ALBULESCU D. şi FORSTNER S., *Contribuţii la studiul chimic al plantei* Pulmonaria mollisima Kern, Farmacia, 1961, *12*, 701—704.

S-a identificat şi s-a urmărit cantitativ alantoina din *Pulmonaria mollisima Kern*, arătîndu-se că, în stadiul de înflorire a plantei, această substanţă se găseşte repartizată astfel: rădăcina 1,39%, tulpina 0,75%, frunza 1,06% şi floarea 0,76%.

S. Vasu

1591. CONTZ O., GHEORGHIU M. şi IURACEC AL., *Studiul cromatografic al alcaloizilor din unele specii de* Aconitium *din Republica Populară Romînă*, Farmacia, 1962, *3*, 159—167.

Folosind cromatografia pe hîrtie, autorii cercetează alcaloizii conţinuţi în speciile *A. collibotryon Rcdb., A. romanicum Wol., A. tauricum Wulf., A. toxicum Rchb., A. vulparia Rchb.* şi *A. lycoctonum* L. stabilind care din aceste specii conţin aconitină; ultimele trei specii menţionate nu conţin aconitină. Se constată la speciile ce conţin alcaloidul cercetat că nu se găsesc produşii de hidroliză ai acestuia nici în probele de plantă proaspătă, nici în cele de plantă păstrată 15 zile la +4°C sau uscată la +60°C.

S. Vasu

1592. СЭЛЭДЖАНУ Н., *Определение манометрическим методом в полевых условиях интенсивности фотосинтеза и дыхания листьев наземных растений*, Revue biol., 1962, **VII**, *2*, 181—192.

Se descrie aplicarea metodei manometrice pentru determinarea intensităţii fotosintezei la frunze în condiţii de cultură. Alimentarea cu bioxid de carbon se face cu ajutorul a 5 ml

soluţie tampon Warburg cu care se îmbibă 2,3 g vată cu scopul de a micşora distanţa difuziei CO_2 prin soluţie şi a se mări suprafaţa de contact dintre faza lichidă şi cea gazoasă în vasul de asimilare. În aceste condiţii echilibrul dintre faze se stabileşte rapid, fără agitare.

D. Moţet-Grigoraş

1593. FODOR GY. şi RACZ G., *Cultivarea pe scară largă a algelor verzi monocelulare şi valoarea nutritivă a prafului de alge*, Rev. med., Tg. Mureş, 1962, *1*, 77—84.

Praful de alge monocelulare poate fi utilizat cu succes ca sursă de proteine în creşterea valorii nutritive a alimentelor. Rezultatele obţinute prin folosirea prafului de alge sînt importante în special pentru suprimarea subalimentaţiei proteice şi pentru prevenirea leziunilor ficatului.

S. Vasu

1594. CEAILAHIAN M. H. şi LOSNIKOVA U. N., *Substanţe giberelinoide şi iarovizarea plantelor*, An. rom.-sov., biol., 1962, *4*, 116—126.

Autorii au identificat substanţele giberelinoide în frunzele unor specii de plante ca grîul, rapiţa şi secara, care prezintă atît forme de primăvară, cît şi de toamnă. Conţinutul diferit constituie una din principalele deosebiri dintre formele de primăvară şi cele de toamnă ; la formele iarovizate de grîu, rapiţă şi secară conţinutul e atît de ridicat, încît plantele de *Rudbeckia*, tratate cu extractele plantelor menţionate, formează tulpini şi înfloresc. La formele de toamnă ale grîului, rapiţei şi secarei conţinutul în aceleaşi substanţe e atît de scăzut, încît extractele frunzelor respective nu au nici un efect asupra creşterii tulpinilor şi înfloririi plantelor de *Rudbeckia*

L. Arnet

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1595. DINU M., *Influenţa radiaţiilor ultraviolete asupra metabolismului glucidic*, Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1962, **XIV**, *1*, 17—27.

Experienţe pe iepuri au arătat că razele ultraviolete exercită o influenţă directă asupra procesului metabolic cutanat şi o influenţă indirectă asupra metabolismului general al glucidelor. Razele ultraviolete acţionează atît direct asupra glicogenului şi conţinutului în glucoză al ţesutului epitelial, cît şi prin o acţiune biologică asupra scoarţei cerebrale, pe cale neuroreflexă şi humorală. Se presupune că pielea are posibilitatea de a descompune glicogenul propriu în glucoză. Razele ultraviolete au un efect pozitiv asupra tonusului muscular, valorificării hranei şi creşterii rezistenţei organismului.

N. Luţă-Moldoveanu

1596. APOSTOL GH., *Cercetări asupra glicemiei unor reptile*, Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1962, **XIV**, *2*, 253—265.

Valorile glicemiei normale la 5 specii de reptile studiate sînt cuprinse în limitele a două categorii distincte : una caracteristică vertebratelor inferioare (la *Natrix*, *Emys* şi *Testudo*) iar cealaltă de tip avian (la *Lacerta* şi *Anguis*). În cursul inaniţiei se produce o scădere considerabilă a nivelului glicemic la toate speciile studiate, făcînd excepţie lacertilienii. Nu s-au constatat variaţii ale glicemiei în funcţie de sex. După administrare de glucoză la *Emys orbicularis* se produce o rapidă şi durabilă hiperglicemie. Sub raport evolutiv, glicemia de tip avian apare la unele reptile superioare (*Lacerta*).

N. Luţă-Moldoveanu

1597. DAMIAN E., IONESCU M. şi TEODORU V., *Acţiunea extractelor din epifize de boi, vaci, tauri şi juninci asupra respiraţiei testiculare in vitro*, Studii şi cercet. endocrinol.. 1962, *3*, 373—375.

Extractele de epifiză ale animalelor mai sus-menţionate produc, fără excepţie, o scădere a consumului de oxigen al testicului. Există variaţii în ce priveşte intensitatea şi semnificaţia procesului.

D. Cotariu

1598. FESZT T., MÓZES M. şi ALMÁSI S., *Modificările efectului hidrazidei acidului izonicotinic la nivelul glandei tiroide în urma administrării de piridoxină*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *3*, 377—381.

La şobolani, piridoxina are o acţiune de inhibare a efectului hipermetabolizant al HIN şi de moderare a activării tiroidei. Dacă se administrează însă piridoxină după oprirea tratamentului cu HIN, nu se accelerează normalizarea metabolismului şi a tabloului histologic al tiroidei.

D. Cotariu

1599. VAISLER L., NANU L., COSTINER E. şi SITARU S., *Modificările glicogenului hepatic la animale cu ciroză experimentală a ficatului şi tratate cu diferite extracte protidice*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *3*, 387—390.

Şobolanii albi intoxicaţi cu CCl_4 şi trataţi cu extracte protidice (de muşchi, plămîni) prezintă o scădere apreciabilă a capacităţii glicogenopexice a ficatului. Tratamentul prelungit produce o creştere a mortalităţii în raport cu martorii netrataţi (40—53%). Se emite ipoteza că hormonul epifizar ar avea un efect specific de protecţie a celulei hepatice.

D. Cotariu

1600. TEITEL A., *Asupra corelațiilor dintre efectele ionilor de bariu și ale celor de potasiu*, Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 341–350.

Lucrînd pe mușchi drepți abdominali de broască, autorul constată că clorura de bariu, în concentrație micromolară, mărește efectele concentrațiilor liminare, dar nu le modifică pe acelea ale concentrațiilor mari de ioni de potasiu; în concentrație milimolară însă bariul blochează efectele concentrațiilor liminare de potasiu și mărește pînă la de 2,6 ori pe acelea ale concentrațiilor mari. Concentrațiile micromolare de ioni de bariu potențează numai efectele potasiului la nivelul sinapselor, pe cînd cele milimolare le potențează și pe cele musculare directe. Aceste efecte ar putea servi la precizarea locului de atac al substanțelor active pe mușchii striați.

H. D. Schell

1601. GHEORGHIU P., SCHWARZ R., STROESCU V. și POPESCU E., *Influențarea compoziției proteice a creierului prin clorpromazină*, Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 361–366.

Dozînd cromatografic aminoacizii din hidrolizate proteice de creier de șobolani tratați cronic cu clorpromazină, autorii constată o creștere a cantității de acid glutamic și alanină față de animale martore. Se presupune existența unei relații între creșterea cantității de acid glutamic din creier și acțiunile centrale ale clorpromazinei.

H. D. Schell

1602. GHEORGHIU P., DOBRESCU D. și STROESCU V., *Studiul influențării sistemului reticulo-endotelial prin substanțe antiinflamatorii. Acțiunea cortizonului și fenilbutazonei asupra funcției metabolice proteice a sistemului reticulo-endotelial*, Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 367–371.

Administrarea fenilbutazonei și a cortizonului la șobolani produce o pronunțată creștere a proporției de alfa-euglobuline serice și o scădere a gamá-euglobulinelor. Aceste modificări ar corespunde unei deprimări a sistemului reticulo-endotelial.

H. D. Schell

1603. NIȚESCU I., CONSTANTINESCU A. și MIHĂIȚĂ M., *Modificarea electroforetică a tabloului proteinelor musculare sub influența ultrasunetelor*, Studii și cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 467–470.

Autorii studiază schimbările tabloului proteinogramei electroforetice la extractul și sucul de carne de pasăre supusă timp de 15 min acțiunii ultrasunetului, și constată că în locul

celor cinci fracţiuni obţinute la extractul apos martor sînt prezente pe electroforegramă numai două fracţiuni. În cazul sucului obţinut prin presarea cărnii se constată, de asemenea, diferenţe în urma acţionării ultrasunetelor asupra cărnii : în locul celor patru fracţiuni din electroforegramele martor, se obţin tot numai două fracţiuni. Ultrasunetele provoacă deci modificări ale proteinelor musculare.

H. D. Schell

1604. CĂPÎLNĂ S. şi GHIZARI E., *Modificările acidului glutamic şi acidului gama aminobutiric (G.A.B.A.) în creierul de şobolan sub acţiunea molibdenului*, Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 471–477.

Autorii arată că Mo^{+6} acţionează asupra sistemului acid glutamic–acid *gama*-aminobutiric–decarboxilaza acidului glutamic, potenţînd activitatea decarboxilazei acidului glutamic.

H. D. Schell

1605. NICOLAU C. T., NICOARĂ S., GRIGORIU G. şi APĂTEANU V., *Grefa de măduvă osoasă heterologă şobolan-şoarece urmărită cu ajutorul reacţiei fosfatazei alcaline leucocitare*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *2*, 265–273.

S-a studiat mecanismul de producere a grefei de măduvă osoasă heterologă şobolan-şoarece, urmărindu-se în paralel modificările hematologice periferice şi centrale, ca şi dinamica fosfatazei alcaline leucocitare, pe frotiuri de sînge periferic, măduvă osoasă şi amprente de organe (ficat, plămîn, splină). Determinarea fosfatazei alcaline leucocitare s-a făcut cu metoda cu cobalt a lui Gomori. S-a constatat că nu este vorba de o stimulare a măduvei osoase a şoarecelui, ci mai mult de o colonizare şi proliferare a celulelor medulare ale şobolanului, care asigură hematopoieza şoarecelui iradiat.

C. Iordache

1606. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., POPESCU I., DOBREANU-ENESCU V., TEODORINI S. şi CIOBANU F., *Cercetări experimentale asupra activităţii miocardice, după administrarea de substanţe blocante de enzime energetice*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *4*, 525–547.

S-a studiat pe cord izolat de broasă, efectul inhibării unor enzime şi a unor procese energetice esenţiale. S-au folosit inhibitori şi dezinhibitori ai activităţii sistemului citocromic (citocromoxidază), a succindehidrogenazei, a dehidrogenazelor ; s-a produs decuplarea şi recuplarea fosforilării oxidative şi inhibarea glicolizei anaerobe. Paralel s-a făcut electrocardiograma

şi mecanograma. Reversarea inhibiţiei produse s-a făcut mai ales prin următoarele cupluri: cianură de potasiu-glucoză; malonat de sodiu-succinat de sodiu; feniluretan-DPN, TPN sau nicotinamidă; fluorură de sodiu DPN, TPN; monoiodacetat-hiposulfit; 2,4-dinitrofenol- ATP.

C. Iordache

1607. HOMORICEANU C., POROJAN I., REITER L., NEGULESCU V. N. şi COSTEA M., *Cercetări asupra eliminării bismutului în urină la bolnavii de sifilis trataţi cu preparate bismutice romîneşti*, Dermatovener., 1962, **VII**, 5, 411–418.

Prin cercetări efectuate pe 34 de pacienţi (29 bolnavi de sifilis şi 5 suferind de alte boli, toţi cu funcţia renală normală) s-a studiat modul de eliminare în urină a bismutului din medicamentele bismutice romîneşti Bismosal şi Bismut liposolubil şi influenţa administrării concomitente de penicilină asupra eliminării bismutului. S-a putut constata că după ce s-a ajuns în organism la o anumită concentraţie de bismut activ, curba de eliminare a acestuia este continuă şi prezintă tendinţa de platou şi că această eliminare descreşte progresiv în pauza dintre seria I şi a II-a de tratament bismutic. Administrarea concomitentă de penicilină nu influenţează eliminarea bismutului din organism.

H. D. Schell

1608. BURUIANĂ L. M., VLĂDUŢIU O., ŞUŢEANU M. şi LOZINSCHI AL., *Activitatea metabolică a unor tumori*, Lucr. şt. Inst. agr. „N. Bălcescu" — Bucureşti, seria C, 1961, **V**, 339–345.

Determinarea activităţii enzimei acetilante (I), a conţinutului în grupări tiol blocate (II), în proteină solubilă (III), în lipide totale (IV) şi apă (V) pe tumori naturale şi transplantele lor la specia cîinelui (limfosarcom vaginal şi pervian, adenofibrosarcom mamar de diferite vîrste) a dus la concluzia că metabolismul şi compoziţia acestora depind în cea mai mare măsură de vîrsta lor (I este mare la începutul procesului de tumorizare, scăzînd sub valorile normale cu timpul, II scade la început şi apoi creşte, III scade cu timpul, IV scade la început şi apoi creşte, V creşte cu timpul) şi că ţesutul neoplazic tinde spre acelaşi tip de metabolism, specific procesului de cancerizare, indiferent de originea tumorii.

H. Filipescu

1609. BURUIANĂ L. M., HADARAG EL., DIACONESCU C. şi DEMA A., *Influenţa extractului pancreatic asupra metabolismului glucidic al spermei*, Lucr. şt. Inst. agr. „N. Bălcescu" — Bucureşti, seria C, 1961, **V**, 409–412.

Extractul pancreatic utilizat ca diluant al spermei sporeşte consumul de oxigen al spermei şi inhibă fructoliza; utilizat însă în concentraţii foarte mici el activează fructoliza; poate constitui deci un instrument pentru deplasarea glicolizei din spermă în sensul dorit.

H. Filipescu

1610. MANTA D., MARIAN P., PALFY FR., BALOGH GH. şi NICHITA S., *Analiza unor constante ale sîngelui la taurinele de rasă Hereford importate la noi în ţară*, Lucr. şt. Inst. agr. „Dr. Petru Groza" — Cluj, **XVII**, 259—264.

Valoarea densităţii integrale a sîngelui, a densităţii plasmei sanguine, a conţinutului de proteine şi de hemoglobină, a volumului eritrocitar, a glicemiei şi lipemiei, a numărului de globule roşii şi albe, cît şi determinarea fracţiunilor proteice, au arătat că primele etape ale procesului de aclimatizare a materialului importat Hereford decurge în condiţii favorabile, fără să se înregistreze tulburări de metabolism. La tineretul metis — Hereford × Bălţată Românească — se modifică însă unele aspecte ale tabloului sangvin (proteina totală, glicemia, lipemia, numărul de globule roşii şi albe sînt inferioare) faţă de tineretul din rasa Hereford.

H. Filipescu

1611. HOLAN T., MICLUŢIA M. şi POGÎNGEANU P., *Valoarea diagnostică a marcării cu fosfor radioactiv in vivo în unele localizări tumorale*, Oncol., radiol., 1962, **I**, *4*, 289—296.

S-a studiat posibilitatea evidenţierii unei activităţi metabolice crescute avînd ca urmare creşterea încorporării fosforului marcat, ca metodă de diagnostic în tumorile maligne. Metoda prezintă un interes deosebit, deoarece în cazul unor rezultate nete vor putea fi evitate biopsiile, contraindicate în unele cazuri. În tumori mamare şi cutanate, creşterea încorporării ^{32}P concordă cu rezultatele bioptice în proporţie de 81—86 %.

M. Furnică

1612. ПОРА Е. А., ТОМА В., ОРОС И. и АБРАХАМ А., *Биохимические изменения при инволюции вилочковой железы*. Revue biol., 1962, **VII**, *1*, 129—136.

În timpul ontogenezei acestei glande numărul aminoacizilor creşte de la 8 la 15 în perioada de la naştere pînă la 3 săptămîni. Apoi numărul lor descreşte treptat pînă la 2 luni, cînd se găsesc doar 10 aminoacizi liberi. La un an rămîn numai 7, din care 2 doar în urme. Nu se observă schimbări analoge în compoziţia aminoacizilor din splină. Involuţia experimentală a timusului se obţine cu ajutorul cortizonului şi depinde de doza administrată. Ea este mai puternică decît cea provocată de ACTH şi are loc atît în ceea ce priveşte greutatea glandei, cît şi în ceea ce priveşte numărul de aminoacizi. Cortizonul poate determina scăderea aminoacizilor liberi de la 10 la 5 la animale normale, în timp ce ACTH-ul se limitează la modificări în greutatea glandei. Unii aminoacizi liberi, ca acidul asparagic, acidul glutamic, glicocolul şi alanina rămîn în compoziţia glandei, indiferent de tipul involuţiei pe care aceasta o suferă (naturală sau experimentală). Suprarenalectomia nu modifică numărul aminoacizilor liberi, deşi greutatea glandei scade simţitor. Creşte de asemenea şi încorporarea ^{32}P, ca şi respiraţia celulară a timusului.

D. Moţet-Grigoraş

1613. ШАНТА Н. и МОТЕЛИКЭ И., *Исследование содержания витамина С у карпа*, Revue biol., 1962, **VII**, *1*, 137-147.

Răspîndirea vitaminei C în organele crapului este asemănătoare cu cea de la alte animale, numai că se observă importante variaţii sezoniere ce se explică prin procesele metabolice la care ia parte această vitamină. Iarna conţinutul în acid ascorbic atinge pragul inferior, iar vara pe cel superior. Aceste nivele nu pot fi mărite prin administrare de acid ascorbic.

D. Moţet-Grigoraş

1614. MÓZES M., FESZT T., VÁRODI K. şi RAVASZ J., *Efectul pH-ului sanguin asupra activităţii tiroidei*, Rev. med., Tg. Mureş, 1961, *3*, 294—297.

Se cercetează modul în care modificările pH-ului sangvin influenţează, la şobolani, consumul de oxigen, tabloul histologic al tiroidei şi efectul tiroxinei exogene. Se constată o scădere a greutăţii corporale şi a consumului de oxigen, precum şi inhibarea efectului hipermetabolizant al tiroxinei sub influenţa substanţelor alcalinizante şi acidifiante. Greutatea glandei tiroide a arătat modificări accentuate — în sensul creşterii — după administrarea de Na HCO_3. Pe baza acestor date, autorii consideră că nu ar fi lipsită de interes cercetarea acţiunii apelor minerale care modifică echilibrul acido-bazic asupra activităţii tiroidei.

S. Vasu

1615. WEINER F., SEBE B. şi BEDŐ S., *Cercetări histochimice în şocul anafilactic experimental. I. Glicogenul şi mucopolizaharidele*, Rev. med., Tg. Mureş, 1962, *1*, 60—61.

Autorii examinează histologic şi histochimic ţesutul hepatic şi splenic al cobailor morţi prin şoc anafilactic. Histologic, în ambele ţesuturi nu s-au găsit modificări; histochimic însă, se constată dispariţia completă sau parţială a glicogenului din ţesutul hepatic şi o „precipitare" granulară a lui în unele celule din splină, spre deosebire de cazurile normale la care s-a observat o repartizare difuză a glicogenului. Se presupun deosebiri asemănătoare şi în cazul altor componente biochimice (proteine, acizi nucleici, enzime).

S. Vasu

1616. MÓZES M. şi FORIKA GY., *Acţiunea modificării repartiţiei de ioni asupra temperaturii corporale la şobolani*, Rev. med., Tg. Mureş, 1962, *2*, 183—186.

Măsurînd temperatura intracolonică a şobolanilor la diferite intervale de timp după administrarea de $MgSO_4$, NaCl, KCl, în diferite concentraţii şi combinaţii între cele 3 săruri utilizate autorii constată că modificarea concentraţiei electroliţilor în organism influenţează arderile celulare şi temperatura corporală. Caracterul acţiunii exercitate de către sărurile cercetate de-

pinde de doza şi modul lor de administrare. Se arată că electroliţii acţionează asupra temperaturii corporale printr-un complex de factori : conţinutul electroliţilor din spaţiul extra- şi intracelular, compoziţia în electroliţi a spaţiului extracelular, acţiunea specifică a sărurilor şi activitatea funcţională a organismului în momentul administrării sărurilor.

S. Vasu

1617. KEMENY GY., *Modificarea conţinutului în mucopolizaharide al uroteliului în cursul administrării de extract de frunze de păr*, Rev. med., Tg. Mureş, 1962, *2*, 186—189.

Se cercetează activitatea fosfatazei alcaline şi modificarea conţinutului în mucopolizaharide din uroteliul şobolanilor albi în urma administrării (prin sondă gastrică) a unui extract apos de frunze de păr. Autorul constată : o creştere a activităţii fosfatazice după 3 şi 10 zile de la administrarea extractului ; dispariţia mucopolizaharidelor acide (din stratul superficial al epiteliului) în prima zi şi reapariţia treptată a lor în zilele următoare administrării extractului. Se ajunge la concluzia că mucopolizaharidele acide au un rol important în impermeabilitatea uroteliului, — care este favorizată şi de extractul de frunze de păr. În felul acesta s-ar explica efectul terapeutic al extractelor ce conţin arbutină în vindecarea inflamaţiilor vezicii urinare.

S. Vasu

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1618. STANCU H., BĂLAN M., PETRESCU C. şi DRAGOMIRESCU M., *Date asupra utilizării glucozei în hipertiroidism*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 283—290.

S-a cercetat utilizarea glucozei la 20 bolnavi de hipertiroidie şi la 10 bolnavi cu sindrom exoftalmic şi eutiroidie. La ambele grupe se constată că valoarea coeficientului de utilizare este apropiată, dar mai scăzută în raport cu normalul. Administrarea de triiodotironină în doze zilnice de 100 mg timp de 10—12 zile (la grupul 2) nu modifică utilizarea glucozei şi a consumului de oxigen.

D. Cotariu

1619. CHIVU V. şi STANCU H., *Efectul triiodotironinei asupra pantei de utilizare a cortizolului la bolnavi cu boala Addison*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 291—295.

Se cercetează dispariţia cortizolului plasmatic la 4 cazuri cu boală Addison şi se constată că acest fenomen este mai rapid decît la normali. După 5—7 zile de tratament cu triiodotironină, utilizarea cortizolului se apropie de normal.

D. Cotariu

1620. BENETATO A., DUMITRESCU-PAPAHAGI E. şi CIPLEA AL., *Influenţa tratamentului cu preparate de reserpină asupra coagulabilităţii sangvine la bolnavii cu hipertensiune arterială*, Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 395—403.

Activitatea fibrinolitică, mult scăzută la bolnavii hipertensivi, se apropie la sfîrşitul tratamentului bolnavilor cu preparate de reserpină, în marea majoritate a cazurilor, de valorile normale. Această observaţie pledează pentru o activare a fenomenelor enzimatice prin stimularea parasimpaticului de către reserpină.

H. D. Schell

1621. MICU D., VELICAN C., GROZEA P., MIHĂILESCU E., MAXIMILIAN Ş. şi MATEESCU D., *Contribuţii la studiul citologic şi enzimocitochimic al ganglionului normal şi patologic. VI. Ganglionul din leucoze*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *3*, 359—366.

Din examinarea frotiurilor de suc ganglionar obţinut prin puncţie s-a constatat că, printre modificările citochimice, comportarea acidului ribonucleic, a glicogenului şi a lipidelor în unele limfocite contribuie la mărirea posibilităţilor de diagnostic, mai ales în leucoza limfatică. Din punct de vedere enzimatic sînt caracteristice scăderea m. oxidazelor, peroxidazelor şi dispariţia aproape totală a fosfatazei alcaline din elementele granulocitare. Acidul ribonucleic, crescut mult în citoplasma limfocitelor şoarecelui cu leucoză experimentală, arată evident caracterul inflamator al perturbărilor apărute.

C. Iordache

1622. MĂRCUŞ N., PĂUN R., ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M. şi URSEA N., *Corelaţii între secreţia gastrică şi uropepsinogen în hepatitele cronice*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *3*, 367—372.

S-a cercetat corelaţia dintre secreţia gastrică şi uropepsinogen în hepatitele cronice şi s-a constatat că în stadiul iniţial al hepatitei cronice media valorilor uropepsinogenului este identică cu aceea a valorilor normale ; pe măsură ce afecţiunea gastrică progresează, valorile uropepsinogenului scad progresiv, precedînd secreţiei clorhidro-peptice, care este net scăzută numai în stadiul final cirogen. Nu există concordanţă între eliminarea uropepsinogenului şi aciditatea gastrică. Corticoterapia stimulează atît excreţia uropepsinei cît şi valorile acidităţii gastrice.

C. Iordache

1623. GAVRILIŢĂ L., BLUM M., ONOFREI T. şi APOSTOL A., *Consideraţii asupra aspectelor histochimice ale fosfatazei alcaline hepatice în hepatita epidemică. Nota I.*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *3*, 387—390.

S-a determinat histochimic, prin metoda Gomori, fosfataza alcalină hepatică pe puncții biopsii hepatice provenite de la bolnavi de hepatită epidemică. S-a constatat o creștere a activității fosfatazei alcaline la nivelul capilarelor sinusoide și a celulelor Kupffer.

C. Iordache

1624. GAVRILĂ I., COMES L., IGNA M., BERDILĂ L., MARINA M., TURCAȘ C. și KIRALY M., *Transaminaza și aldolaza în diagnosticul hepatitei epidemice*, Studii și cercetări med.int., 1962, **III**, *4*, 461—471.

În 80% din cazurile de hepatită epidemică valorile transaminazei au depășit 300 u. iar ale aldolazei 20 u. Valorile semnificative pentru diagnosticul de hepatită epidemică sînt numai de la 600 u. transaminază și 30 u. aldolază în sus, valori care se întîlnesc la începutul bolii. Cu cît boala înaintează valorile scad descriind o curbă inversă aceleia a probelor de disproteinemie.

C. Iordache

1625. STOICHIȚĂ M., STEINBACH M., GHEORGHIU M. și GEORGESCU M., *Studii referitoare la influența grăsimilor alimentare asupra coagulării la bolnavii cu ateroscleroză, Nota I. Modificările coagulării la bolnavii cu ateroscleroză*, Studii și cercet. med. int., 1962, **III**, *5*, 593—599.

Bolnavii cu ateroscleroză au modificări caracteristice în ceea ce privește coagularea : fibrina se formează foarte ușor, deci o hipercoagulare ; modificări cantitative și calitative ale fibrinogenului și lipsa de consum a protrombinei.

C. Iordache

1626. STOICHIȚĂ M., STEINBACH M., GHEORGHIU M. și GEORGESCU M., *Studii referitoare la influența grăsimilor alimentare asupra coagulării la bolnavii cu ateroscleroză. Nota II. Studiul coagulării în cursul alimentației bogate în acizi grași nesaturați*, Studii și cercet. med. int., 1962, **III**, *5*, 601—605.

S-au studiat modificările coagulării la un lot de bolnavi care timp de 1—2 luni au ingerat zilnic cîte 50 g ulei de porumb crud, iar alt lot a ținut regim 10 zile cu 50 g ulei de floarea soarelui, 10 zile cu 50 g unt și 10 zile cu 50 g ulei de porumb. S-au controlat lipidele și probele de coagulare, înainte și după fiecare cură dietetică. S-a constatat că regimul alimentar ce conține 50 g unt pe zi agravează hipercoagularea la acești bolnavi, pe cînd acizii grași nesaturați nu o influențează . Variațiile fracțiunilor lipidice dozate cu metodele uzuale (colesterol, lipide totale, raportul dintre *alfa*-și *beta*-lipoproteine și proba Kunkel) au o oarecare contingență cu modificările coagulării, dar nu explică modificările caracteristice.

C. Iordache

1627. BĂLĂCEANU M., CHIVU V. şi CIOBANU V., *Cercetări asupra eliminării catecolaminelor în poliartrita cronică evolutivă*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *5*, 607–615.

S-a determinat eliminarea urinară a catecolaminelor libere şi conjugate prin metoda lui von Euler şi Floding, la bolnavi cu poliartrită cronică evolutivă. Eliminările au fost în medie de 22,15 mg/24 de ore pentru noradrenalină şi de 9,25 mg/24 de ore pentru adrenalină, raportul N/A fiind 2,39. În 45% din cazuri raportul N/A a fost sub 2. Se indică astfel o eliminare a noradrenalinei în medie la limita inferioară a normalului şi cu un raport N/A mic, aproape subnormal.

C. Iordache

1628. IOTA C. G., STOICA GH. şi CIOBANU V., *Observaţii critice privind urmărirea puterii histaminopexice a serului în poliartrita cronică evolutivă*, Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *5*, 617–622.

Puterea histaminopexică a serului la bolnavi cu poliartrită cronică evolutivă nu este un test destul de exact pentru evaluarea terenului alergic.

C. Iordache

1629. CONSTANTINESCU E., MISON-CRIGHEL N., COSTA-FORU D., LUCA N., PINTILIE C. şi SOLOMONOVICI M., *Efectul administrării de HIN asupra unor trepte metabolice intermediare dependente de codehidrazele I şi II la bolnavii de nevroză astenică*, Studii şi cercet. neurol., 1962, **VII**, *2*, 211–221.

Administrarea unei doze de 300 mg hidrazidă a acidului izonicotinic (HIN) determină, la martori, o creştere semnificativă a acidului α-cetoglutaric, o scădere a acidului citric şi o uşoară creştere a azotului aminic. Administrarea de HIN timp de 5 zile, în doze fracţionate de cîte 300 mg zilnic, nu modifică nivelul glucozei, al acidului piruvic, acidului lactic, acidului α-cetoglutaric, acid citric şi azotului aminic din sînge. După tratamenul de 10 zile al bolnavilor cu HIN (300 mg zilnic) creşte nivelul acidului α-cetoglutaric şi al acidului citric. Administrarea la nevrotici de HIN asociată cu glucoză, determină normalizarea curbelor acidului α-cetoglutaric, ale azotului aminic şi acidului citric. Autorii discută posibilitatea acţiunii HIN asupra codehidrazelor I şi II.

N. Luţă-Moldoveanu

1630. COSTA-FORU D., *Ceruloplasmina în nevroza astenică.*, Studii şi cercet. neurol., 1962, **VII**, *2*, 253–256.

S-a determinat activitatea ceruloplasminei şi cuprul din sîngele a 24 de bolnavi de nevroză astenică (13 femei şi 11 bărbaţi) şi 13 martori (9 femei şi 4 bărbaţi). Valorile medii ale

eupremiei la cei bolnavi sînt sub limita normală la bărbaţi (85 mg) şi la limita normală la femei (90 mg). Activitatea ceruloplasminei (determinată prin reacţia de oxidare a dimetil-*para*-fenilendiaminei) este mult mai intensă la nevroticii bolnavi de mai multă vreme şi la cei cu simptome psihice de tip depresiv anxios sau obsesiv-folic.

N. Luţă-Moldoveanu

1631. GAVRILESCU C., NADOLU GH. şi NACU A., *Studiu asupra eliminării steroizilor sexuali în disgravidii*, Obstetr. ginecol., 1962, *3*, 243 — 244.

Se urmăreşte eliminarea pregnandiolului, fenolsteroizilor şi *17*-cetosteroizilor în diferite forme de disgravidii, constatîndu-se în general o insuficienţă hormonală moderată globală. Disfuncţiile hormonale sînt mai evidente la cazurile cu disgravidie tardivă şi sînt în general în raport cu intensitatea fenomenelor clinice.

S. Vasu

1632. TUDOR I., ROMAN I. şi RĂDULESCU F., *Contribuţii la studiul electroforezei proteinelor serice în disgravidiile tardive.* Obstetr., ginecol., 1962, *3*, 245—247.

Sînt cercetate prin metoda electroforezei pe hîrtie, proteinele serice în disgravidii, evidenţiindu-se modificări însemnate la diferitele fracţiuni proteice, în special la disgravidiile din a doua jumătate a sarcinii. Astfel se remarcă: a) hipoalbuminemie constantă, b) hiperglobulinemie datorită creşterii subfracţiunilor α_1-globulinice şi α_2-globulinice, c) creşterea β-globulinelor şi d) creşterea γ-globulinelor.

S. Vasu

1633. CĂPRIOARĂ D., CONSTANTINESCU M., DEAC M., NEGRUŢIU I. şi MUNTEANU S., *Timpul de protrombină şi proteinograma în disgravidii*, Obstetr., ginecol., 1962, *3*, 248.

Sînt discutate rezultatele obţinute prin urmărirea timpului de protrombină şi proteinograma serului sanguin în 77 de cazuri de sarcină patologică, constatîndu-se scăderea proteinelor totale şi a raportului albumine/globuline, fără însă a se realiza un tablou electroforetic caracteristic. În cursul tratamentului disgravidiilor precoce, paralel cu ameliorarea tabloului clinic, autorii indică o revenire la normal a timpului de protrombină.

S. Vasu

1634. ZOLOG N., GYULAI M., ROCSIN M. şi KOHN H., *Studiul permeabilităţii capilare prin proba Landis în boala glaucomatoasă*, Oftalmol., 1962, *3*, 185—187.

S-a studiat permeabilitatea capilară la 30 de bolnavi cu glaucom cronic, cu ajutorul probei Landis, şi s-au constatat pierderi proteice variind între 0,03 şi 1,88 g. Se trage concluzia că în glaucom se produce o slăbire a barierei hematooculare, ce permite trecerea în camerele oculare a unei cantităţi mai mari de apă, proteine şi săruri, producînd astfel hipertensiune oculară.

D. Cotariu

1635. ZOLOG N., GYULAI M. şi LEIBOVICI M., *Modificările cantitative ale lichidului extracelular şi variaţiile asociate ale presiunii intraoculare provocate de diuramid la glaucomatoşi*, Oftalmol., 1962, *3*, 189—192.

S-au determinat concomitent modificările cantitative ale lichidului extracelular şi variaţiile presiunii intraoculare la 15 glaucomatoşi, după administrare de diuramid. Se constată un paralelism între scăderea cantităţii de lichid extracelular şi diminuarea tensiunii oculare.

D. Cotariu

1636. MIRON M. S., BRUCĂR I. şi VIŞAN A. M., *Limitele utilizării acetazolamidei în oftalmologie*, Oftalmol., 1962, *3*, 243—248.

Acetazolamida se utilizează în oftalmologie pentru scăderea tensiunii intraoculare ;această acţiune s-ar datori rolului de inhibitor al anhidrazei carbonice pe care-l exercită acetazolamida la nivelul corpului ciliar. Se discută valoarea utilizării substanţei respective în special pentru tratamentul glaucomului.

L. Arnet

1637. IDU M. S., *Asupra colesterolemiei şi metodelor de dozare*, Viaţa med., 1962, **IX**, *14*, 953—958.

Autorul trece în revistă valorile colesterolemiei în cazuri normale şi în diferite stări patologice, modul în care poate fi influenţată colesterolemia, precum şi metodele de dozare, şi arată în încheiere că singură cunoaşterea colesterolemiei nu are semnificaţie ; pentru interpretarea ei trebuie să se ţină seama şi de alte date clinice şi de laborator.

D. Moţet-Grigoraş

1638. ILIESCU C. C., ILIESCU M., POPESCU D., IACOBINI P., CONSTANTINESCU A. CONSTANTINESCU S., NIŢU S. şi VASILESCU O., *Observaţii clinice asupra efectelor triparanolului (MER 29) în boala coronariană*, Viaţa med., 1962, **IX**, *16*, 993—941.

Triparanolul acţionează inhibînd biosinteza colesterolului în stadiul final de desmosterol. Prin administrarea acestui medicament la hipercolesterolemici cu ateroscleroză coronariană colesterolul total a scăzut în medie cu 78 mg%, iar raportul β/α lipoproteine cu 12%. Unele efecte nocive semnalate în terapia de lungă durată impun menţinerea bolnavilor trataţi sub un control atent.

D. Moţet-Grigoraş

XI. BIOCHIMIA NUTRIŢIEI

1639. BURLACU GH. şi VLĂDESCU C., *Contribuţii la studiul acţiunii dinamice specifice a cîtorva alimente administrate şobolanilor albi*, Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1962, **XIV**, *1*, 29—46.

Valorile acţiunii dinamice specifice (a.d.s.) pentru 100 Kcal ingerate au fost : 19,13% Kcal (la masculi) şi 21,5% (la femele), pentru proteine (făină de sînge) ; 5,58% Kcal (la masculi) şi 7,57% Kcal (la femele) pentru glucide (glucoză) şi 1,8 Kcal (la masculi) şi 1,01 Kcal (la femele) pentru lipide (ulei de floarea soarelui). S-a stabilit o corelaţie pozitivă între valorile ADS şi evoluţia glicemiei după ingestia de proteine, ceea ce poate indica originea caloriilor extrabazale în produsele glucosintezei proteice. Nu se constată nici un paralelism între evoluţia ADS şi glicemie, după ingerarea glucozei.

N. Luţă-Moldoveanu

1640. LUNGU AL. şi LUNGU M., *Influenţa inaniţiei şi a realimentării asupra ritmurilor cotidiene ale temperaturii şi ale consumului de oxigen*, Studii şi cercet. endocrinol., 1962, *2*, 237—247.

Suprimarea alimentării timp de 6 zile la şobolani albi a provocat o perturbare apreciabilă a ritmului normal al temperaturii rectale şi a consumului de oxigen, în sensul unei dispariţii a ritmurilor. Tulburările ritmului temperaturii rectale se observă mai rapid (după o zi de inaniţie) decît acelea ale consumului de oxigen. Realimentarea restabileşte cele 2 ritmuri abia după o perioadă de 4—5 zile.

D. Cotariu

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ

XIII. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

1641. GRUZA P., CORNEANU M. şi BUŞNEAG C., *Influenţa comparativă a clorhidratului de oxifenilciclimină (Daricon) şi a butilbromurii de scopolamină (Scobutil) asupra secreţiei gastrice*, Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 323—327.

Experienţe efectuate pe ciini au arătat că administrarea substanţelor amintite produce o scădere a concentraţiei sucului gastric şi a conţinutului în pepsină. S-a constatat totodată că în timp ce Dariconul reduce aciditatea liberă şi nu o influenţează pe cea totală, Scobutilul nu modifică aciditatea liberă şi o măreşte pe cea totală. În urma administrării Dariconului are loc şi o uşoară scădere a potasiului.

H. D. Schell

1642. TEITEL A., STROESCU V. şi ŞTEFLEA D., *Cercetări privind acţiunea trofică şi stimulantă a procainei asupra organelor izolate.* Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 351—359.

Studiind efectul procainei în concentraţii mici (10^{-9} M) asupra diferitelor organe izolate (muşchiul drept abdominal de broască, ileonul terminal de iepure şi de cobai) autorii constată că produsul favorizează activitatea spontană, măreşte reactivitatea acestora la substanţe spastice şi permite o supravieţuire mai îndelungată. Aceste efecte stimulante s-ar datori acţiunii de menţinere şi de refacere a potenţialului electric fiziologic al membranelor celulare.

H. D. Schell

1643. CÎRSTEA M. şi SUHACIU GH., *Reactivitatea anafilactică şi reactivitatea la histamină în raport cu vîrsta la cobai,* Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 389—394.

Căutînd să precizeze dacă există deosebiri în ceea ce priveşte reactivitatea anafilactică la cobai în vîrstă înaintată în comparaţie cu cobaii tineri, autorii au utilizat tehnica anafilaxiei pasive şi au constatat că letalitatea anafilactică este semnificativ mai scăzută la animalele bătrîne. În ceea ce priveşte însă efectul produs de histamină la cobaii tineri şi la cobaii bătrîni, autorii nu au găsit diferenţe semnificative.

H. D. Schell

1644. CĂPÎLNĂ S., ABABEI L. şi ŞTEFĂNESCU P., *Variaţiile în activitatea enzimatică a pirofosfatazei anorganice în ficat şi creier de şoarece intoxicat cu CCl_4 şi în cursul procesului de regenerare,* Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *3*, 479—484.

CCl_4 inhibă pirofosfataza hepatică şi pe cea a creierului, iar injectarea concomitentă de glucoză reactivează parţial activitatea enzimatică. Autorii subliniază faptul că CCl_4 ar avea o acţiune selectivă asupra parenchimului hepatic şi asupra mitocondriilor şi ar inhiba selectiv enzimele —SH.

H. D. Schell

1645. GHEORGHIU P., STROESCU V., MANOLESCU EM., DOBRESCU D., VANGHELOVICI M. şi DEMETRESCU C., *Acţiunea unor derivaţi hidrazidici ai acidului difenilacetic din seria acidului α-benzoilaminocinamic asupra sistemului nervos vegetativ*, Farmacia, 1961, *12*, 711—715.

Sînt cercetaţi 6 derivaţi hidrazidici, arătîndu-se că ei prezintă o slabă acţiune hipotensivă, nu influenţează efectele periferice şi ganglionare acetilcolinice şi nu modifică hipotensiunea histaminică. Doi dintre derivaţii cercetaţi (difenilacetilhidrazida acidului α-benzoilamino-*meta*-nitroxicinamic şi difenilacetilhidrazida acidului α-benzoilamino-*orto*-acetoxicinamic) potenţează hipertensiunea adrenalinică.

S. Vasu

1646. TEITEL A., GHEORGHIU P., BRATU V., STROESCU V., MANOLESCU EM., VANGHELOVICI M., DEMETRESCU C., GANE P., POPA A. şi SCHWARTZ R. *Asupra activităţii antituberculoase a unor noi hidrazide substituite din seria acidului α-benzoil-aminocinamic.* Farmacia, 1962, *3*, 169—174.

Cercetînd activitateaantituberculoasă a 15 derivaţi ai acidului α-benzoilaminocinamic, autorii remarcă în mod deosebit pe aceea a izonicotinilhidrazidei acidului α-benzoil-*p*-dimetilaminocinamic. Acest compus prezintă o activitate antituberculoasă apropiată de aceea a hidrazidei acidului izonicotinic.

S. Vasu

VIZITA ACADEMICIANULUI A. V. PALLADIN

La invitaţia Prezidiului Academiei R.P.R., academicianul A. V. Palladin, directorul Institutului de biochimie din Kiev al Academiei de Ştiinţe a R.S.S. Ucraina, membru de onoare al Academiei R.P.R., a vizitat ţara noastră între 16 şi 30 octombrie 1962.

Vizita academicianului A. V. Palladin a fost aşteptată cu mult interes de biochimişti, medici şi biologi, fiind cunoscută activitatea neobosită şi multilaterală a oaspetelui sovietic. Activitatea sa ştiinţifică, începută în laboratoarele marelui fiziolog rus I.P. Pavlov şi continuată apoi în laboratoarele lui N. E. Vvedenski, cuprinde în special probleme privind biochimia sistemului nervos central, biochimia activităţii musculare, biochimia nutriţiei şi a vitaminelor. Este cunoscută de asemenea şcoala de biochimişti formată de el la Kiev, ca şi munca depusă ca profesor şi pedagog, în educarea unor generaţii întregi de studenţi în domeniul biochimiei. Cartea sa „Manual de chimie biologică" este larg folosită în facultăţi şi a fost de altfel tradusă şi în ţara noastră.

Fiind la a treia vizită pe care o face în R.P.R., acad. A.V. Palladin s-a interesat atît de stadiul actual al cercetării ştiinţifice în domeniul biochimiei, cît şi de prefacerile care au avut loc în ultimii ani în domeniul social-cultural.

În cursul şederii sale în ţara noastră, acad. A. V. Palladin a vizitat în primul rînd Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., condus de acad. E. Macovschi, şi s-a interesat îndeaproape de lucrările Institutului. În şedinţa plenară care a avut loc cu acest prilej, acad. E. Macovschi a prezentat personalitatea multilaterală a oaspetelui care, printre altele, a contribuit activ la organizarea Institutului în primii ani de activitate ai acestuia, iar acad. A. V. Palladin a răspuns printr-o prezentare a activităţii ştiinţifice care se desfăşoară la Institutul de biochimie din Kiev.

În cursul şederii sale în Bucureşti, oaspetele a vizitat de asemenea următoarele institute şi colective : Institutul de studii romîno-sovietic (director : acad. P. Constantinescu-Iaşi), Institutul de fiziologie normală şi patologică (director : acad. Gr. Benetato), Institutul de endocrinologie (director : acad. Şt. Milcu), Institutul de neurologie (director : acad. A. Kreindler), Catedra de biochimie a I.M.F. şi Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R. (sub conducerea prof. S. Oeriu, membru corespondent al Academiei R.P.R.). Acad. A. V. Palladin a avut întrevederi cu conducătorii şi colaboratorii acestor instituţii şi s-a interesat atît de cercetările şi rezultatele lor, cît şi de utilajul ştiinţific cu care sînt dotate laboratoarele de biochimie.

Acad. A. V. Palladin a ţinut trei conferinţe în Bucureşti : în cadrul Uniunii Societăţii Ştiinţelor Medicale, la înfiinţarea Secţiei de biochimie, despre „Localizarea fermenţilor pe structurile subcelulare din creier" ; în aula Academiei R.P.R. despre „Metabolismul proteic din creier

în condiţiile hibernării" şi la Casa prieteniei romîno-sovietice A.R.L.U.S. despre „Lenin şi ştiinţa".

Pentru a putea lua cunoştinţă de prefacerile care au auvt loc pe tărîm social-cultural în ultimii ani, acad. A. V. Palladin a vizitat noile cartiere şi edificii construite în Bucureşti şi pe litoralul Mării Negre. Au mai fost vizitate localităţile de pe Valea Prahovei, muzeul din Bran, Braşovul şi Poiana Braşovului.

Acad. A. V. Palladin şi-a încheiat vizita în ţara noastră comunicîndu-şi părerile şi impresiile atît în presă, cît şi la posturile noastre de radio şi televiziune.

În cadrul schimbului de articole ştiinţifice dintre revista „Studii şi cercetări de biochimie" şi revista de biochimie a Institutului de biochimie din Kiev, iniţiat cu acest prilej, revista noastră a publicat două articole ale acad. A. V. Palladin, în numerele 1 şi 2 din 1963.

Corina Iordache

Cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

ÎNFIINŢAREA SECŢIEI DE BIOCHIMIE MEDICALĂ

În ziua de 24 octombrie 1962 a avut loc, la Uniunea Societăţilor de Ştiinţe Medicale din R.P.R., şedinţa de deschidere a Secţiei de biochimie medicală a Societăţii de fiziologie a Uniunii Societăţilor de Ştiinţe Medicale. Şedinţa a fost prezidată de acad. prof. dr. Şt. Milcu, preşedintele Uniunii Societăţilor de Ştiinţe Medicale. Printre oamenii de ştiinţă care au participat, menţionăm pe acad. prof. dr. E. Macovschi, acad. prof. dr. N. G. Lupu, acad. prof. dr. Gr. Benetato, prof. dr. Eug. Soru, precum şi numeroşi cercetători.

Acad. prof. dr. Şt. Milcu a prezentat pe acad. A. V. Palladin, directorul Institutului de biochimie din Kiev (U.R.S.S.), care a expus comunicarea : „Localizarea fermenţilor pe structurile subcelulare din creier", însoţită de proiecţii.

★

În ziua de 20 noiembrie 1962 a avut loc, la sediul Uniunii Societăţilor de Ştiinţe Medicale, şedinţa Secţiei de biochimie medicală a Societăţii de fiziologie, prezidată de prof. dr. S. Oeriu, cu următoarea ordine de zi :

1. *Prof. dr. S. Oeriu, I. Tănase* (Colectivul de chimioterapie) : Aspecte biochimice ale procesului de îmbătrînire în sistemul nervos central.

Nota V. Rolul cisteinei şi al vitaminelor de metilare şi de metabolizare a sulfului asupra aminoacizilor din cortexul cerebelului la şobolani de diferite vîrste.

Nota VI. Rolul cisteinei şi al vitaminelor de metilare şi de metabolizare a sulfului asupra aminoacizilor din substanţa albă a cerebelului la şobolani în funcţie de vîrstă.

Nota VII. Rolul cisteinei şi al vitaminelor de metilare şi de metabolizare a sulfului asupra aminoacizilor din bulbul de şobolan în funcţie de vîrstă.

Nota VIII. Rolul cisteinei şi al vitaminelor de metilare şi de metabolizare a sulfului asupra aminoacizilor din mezencefalul şobolanilor în funcţie de vîrstă.

Nota IX. Rolul cisteinei şi al vitaminelor de metilare şi de metabolizare a sulfului asupra acizilor aminaţi din măduva spinării a şobolanilor de diferite vîrste.

2. *Prof. dr. S. Oeriu* (Colectivul de chimioterapie) : Date noi asupra procesului de îmbătrînire în sistemul nervos central. Sinteză.

CRONICA BIOCHIMIEI LA IAȘI

În luna aprilie 1962, cu ocazia alegerilor din cadrul Societății de medici și naturaliști, filiala Iași a Uniunii Societăților de Științe Medicale din R.P.R., a fost ales și biroul Secției de biochimie din Societatea de fiziologie, filiala Iași.

Ca președinte al Secției de biochimie, filiala Iași, a fost ales conf. dr. A. Batcu, membru în comitetul de conducere al Secției de biochimie din R.P.R. Ca membri în birou au fost alese chimistele Drăgan Margareta și Mărculescu Cristina.

Activitatea secției în anul 1962 a fost următoarea :

Ședința din 19 ianuarie 1962

Prof. dr. Maria Sibi și conf. dr. A. Batcu : Privire generală asupra Congresului al V-lea de biochimie de la Moscova, din 10—16 august 1961.

F. Șerban și I. Cobeț. : Expoziția tehnico-științifică de la Congresul de biochimie de la Moscova.

Cu această ocazie a fost organizată, în una din sălile Laboratorului de biochimie, o expoziție cu materialele documentare aduse de participanții la congres.

Ședința din 30 martie 1962

Dr. Ababei Leonid : Oxidarea de substrat la nivelul reticulocitelor.

S-au urmărit procesele metabolice la nivelul reticulocitelor atunci cînd acestea sînt incubate în prezența a diferite substraturi ale ciclului Krebs. Randamentul maxim energetic al fosforilărilor se obține atunci cînd se folosește ca substrat acidul oxalacetic sau acidul cetoglutaric. Un efect asemănător se obține și atunci cînd se folosește ca substrat acidul aspartic sau acidul glutamic, care prin dezaminare duc la acizii oxalacetic și cetoglutaric. Acizii malic și fumaric nu pot constitui surse de energie pentru reticulocite. Inozita are un efect asemănător cu acela al glucozei. Experiențele au fost făcute și în prezență de dinitrofenol, agent decuplant al fosforilării oxidative. Acizii cetoglutaric și oxalacetic îndepărtează efectul decuplant al dinitrofenolului.

Ședința din 4 mai 1962

Prof. dr. I. Manta (I.M.F. Cluj) : Cercetările Catedrei de biochimie de la I.M.F. Cluj asupra modificărilor biochimice clinice și experimentale în ateromatoză.

Ședința din 21 iunie
(în cadrul Societății de Fiziologie)

C. Rotaru : Considerații asupra sindromului umoral al oboselii (referat general).

V. Răşcanu, D. Dorogan, C. Rotaru, I. Ștefan, Paula Drăgan : Contribuții la studiul variațiilor fizico-chimice ale sîngelui în timpul colapsului hemoragic experimental și al reanimării.

Continuînd cercetările referitoare la modificările compoziției fizico-chimice a sîngelui, consecutiv decorticării cerebrale mono- și bilaterale, autorii urmăresc să stabilească dacă leziunile corticale cerebrale, consecutive hemoragiilor masive, determină sau nu tulburări ale homeostaziei sîngelui cîinilor reanimați. Rezultatele cercetărilor întreprinse arată apariția unor tulbu-

rări profunde atît ale constantelor fizice (densitatea, tensiunea superficială, conductibilitatea, indicele refractometric), cît şi ale celor chimice (ionii de Na, K, Ca, Mg; albuminele hidrosolubile şi fracţiunile electroforetice) manifestate iniţial printr-o scădere, afară de ionii de Ca şi de *alfa*-globuline, iar apoi prin tendinţa de revenire la valoarea lor iniţială. Scăderea iniţială a constantelor este atribuită de autori migrării dinspre ţesuturi în spre sîngele din circulaţia generală, mai ales a apei, *alfa*-globulinelor şi calciului, iar tendinţa de revenire a constantelor la valorile iniţiale s-ar datora, după autori, reacţiei osmoreceptorilor din regiunea nucleilor supraoptici şi parareticulari, a căror excitare declanşează scăderea iniţială a presiunii osmotice şi oncotice sanguine, determinînd modificarea permeabilităţii membranelor celulare faţă de albuminele hidrosolubile şi de ionii cercetaţi de autori, cu migrarea lor corespunzătoare.

C. Rotaru, Gh. Pendefunda, I. Ştefan: Contribuţii la studiul reacţiilor vasculare pletismografice în miastenie.

Folosind răspunsul vascular pletismografic la exerciţiul muscular, se constată modificări caracteristice şi constante în diverse forme clinice de miastenie. Acestea se accentuează sub influenţa efortului muscular şi au tendinţa de a căpăta caracteristici de normalizare sub influenţa neoezerinei. Concordanţa dintre modificările volumetrice vasculare şi fazele contracţiei musculare susţinute este caracteristică şi poate exprima intensitatea fenomenelor şi forma clinică a miasteniei. Solicitarea organismului prin lucru fizic şi influenţa anticolinesterazicelor pot reprezenta criterii pentru evidenţierea fenomenelor spinale incipiente şi de intensitate moderată, în formele cu debut bulbar, fie clinic, fie oftalmologic, unde clinic nu sînt relevate.

Şedinţa din 12 octombrie 1962

Academician E. Macovschi (Bucureşti): Impresii de la cel de-al VIII-lea Congres internaţional al Societăţii pentru substanţe vitale, ţinut în Austria, în 1962.

Şedinţa din 8 noiembrie 1962

Al. Batcu: Metodele de cercetare a proteinemiei şi rezultatele lor (referat general).

Al. Batcu, Ioana Colea: Consideraţii asupra dozării proteinemiei prin reacţia biuretului.

Se prezintă un studiu al rezultatelor obţinute prin diverse tehnici de dozare a proteinelor pe principiul reacţiei biuretului, stabilit încă de E. Riegler, comparativ cu metoda azotometrică şi refractometrică.

Şedinţa din 6 decembrie 1962

I. Lungu, Margareta Drăgan: Utilizarea O.C.T. (ornitil-carbamil transferază) ca test specific al fenomenului de citoliză hepatică (referat general).

Margareta Drăgan: Tehnica modificată a determinării O.C.T.-ului.

Se modifică tehnica originală, înlocuind celulele Konway printr-un dispozitiv de distilare a amoniacului.

Natalia Ursu, Tatiana Sauciuc, Elena Ciocîrlan: Unele aspecte noi ale curbelor hiperglicemice.

Cercetîndu-se sistemul hemoglicoregulator prin proba hiperglicemiei provocate la bolnavii cu cataractă şi la bolnavii hipofizari şi adisonieni, s-au constatat unele aspecte particulare ale curbelor de hiperglicemie: în dublă cocoaşă, aplatizate sau tip insuficienţă hepatică.

Şedinţa din 27 decembrie 1962

Cornelia Popescu: Aminele presive (referat general).

Cornelia Popescu: Asupra metodei de dozare a cateholaminelor.

Autoarea prezintă experienţa personală asupra tehnicii de dozare a cateholaminelor, făcînd unele modificări ce simplifică lucrul în laborator, fără ca rezultatele să fie diferite de cele ale autorilor metodei (Euler şi Floding).

Eufrosina Teodorescu : Contribuţii la dozarea mucoproteinelor în reumatism.

Se prezintă rezultatul dozării mucoproteinelor la copii bolnavi de reumatism, înainte şi după tratament. S-a constatat o creştere a mucoproteinelor, care nu este însă paralelă cu gravitatea sau evoluţia bolii.

Silvia Drăgan : Tabloul biochimic într-un caz particular de disfuncţie tubulară în evoluţia glomerulonefritei acute difuze streptococice (prezentare de caz clinic).

CERCETAREA BIOCHIMICĂ MANIFESTATĂ ÎN CADRUL SESIUNILOR ŞTIINŢIFICE ALE INSTITUTELOR DE ÎNVĂŢĂMÎNT SUPERIOR DIN IAŞI

Sesiunea ştiinţifică a Institutului agronomic „Ion Ionescu de la Brad" (24—27 februarie 1962)

Pintea C., Tărnăuceanu Elena, Ciurea G., Untu A., Leonte A. : Eficienţa soluţiei amoniacale şi a ureei ca îngrăşăminte de azot la porumb.

Eficienţa microelementelor combinate la porumb, floarea-soarelui şi sfecla de zahăr.

Platon Maria : Dinamica glucidelor la porumbul portocaliu şi H.D.-203.

Sandu Ville C., Batcu A., Lazăr A., Hatmanu I. : Studiul ciupercii *Septoria helianthi Ell et Kell.*

Drugociu Gh., Turliuc O., Schaas I., Andreescu A., Ţipu I. : Cercetări privind rolul vitaminelor A şi E asupra spermatogenezei.

Ghimicescu Gh., Cotea V., Ghimicescu Camelia, Jianu L., Dumbravă Elena, Cotea Victoria : Contribuţii la studiul vinurilor din podgoria Cotnari.

Cotea V., Dumbravă Elena : Valoarea raportului alcool extract şi a raportului Roos modificat, la vinurile provenite din podgoriile Moldovei.

Ţîrdea C. şi Ţîrdea A. : Contribuţii la studiul factorilor care determină fermentaţia malolactică a vinului.

*

Cea de-a IX-a Sesiune ştiinţifică a Universităţii „Alex. I. Cuza" Iaşi, Sesiunea Grigore Cobîlcescu (25—28 octombrie 1962)

Văscăuţeanu E., Jurcă V., Sîrmon E. : Combinaţii ale nitrofuranului cu acid ascorbic şi cu acizii aminaţi (I).

Jitaru P., Afrigoroaie Şt., Afrigoroaie G., Ţibu M., Viscrian E. : Influenţa cîmpurilor electromagnetice asupra distribuirii fosforului în organism, cercetată cu ajutorul ^{32}P la cobai. Influenţa hibernării asupra fixării ^{131}I în tiroidă la popîndăi.

Şerbănescu O., Jitaru P. : Acumularea şi repartiţia în organe a ^{32}P la gobiide.

Străchinaru I. : Despre eficienţa acţiunilor psihopedagogice exercitate asupra copiilor oligofreni trataţi cu acid glutamic şi cafeină.

*

Sesiunea ştiinţifică jubiliară a semicentenarului Institutului politehnic „Gheorghe Asachi" (*9—11 noiembrie 1962*)

Grindea M., Forst T. : Acţiunea bicromatului de potasiu şi a formaldehidei asupra lînei.

Simionescu Cristofor, Diaconescu V., Poppel E., Asandei N., Obrocea P. : Cercetări asupra comportării celulozelor din plante anuale (stuf, paie) în fabricarea hîrtiei.

Matei Ilie, Grigoraş Maria : Reacţii de transesterificare pe catena celulozică (I), esteri aminaţi şi transformări chmice ale acestora.

Alexa Gh., Chiriţă Gh., Chiriţă Aglaia : Influenţa aciditătii asupra stabilităţii legăturii formaldehidei cu colagenul.

Simionescu C., Rozmarin Gh. : Cercetări privind mecanismul destrucţiei fotochimice şi termice asupra unor materiale fibroase (celulozice).

Grindea M., Ifrim Sorel : Influenţa soluţiilor diluate de acid sulfuric asupra lînii. Contribuţii la studiul influenţei agenţilor alcalini asupra lînei.

Simionescu C., Oprea G., Feldman D. : Grefarea celulozei cu nitril poliacrilic.

Rozmarin Gh. : Asupra polimolecularităţii unor celuloze degradate.

Consfătuirea interregională „Limfangiomul şi relaţiile sale cu restul sistemului reticulo-histiocitar" (*noiembrie 1962*)

Velican C., Velican D. : Histochimia mucopolizaharidelor în limfoganglion.

Zamfirescu-Gheorghiu Marcela, Petrescu M., Grozea P., Velican D., Sighetea Elena : Cercetări asupra citocromoxidazei şi succindehidrazei în limfoganglionul normal şi patologic.

Gociu M., Grozea P. : Histochimia complexelor glucido-proteice în hemopatiile maligne, leucozele acute şi cronice.

Schuller L., Papp Z., Tuka P., Kerekeş M., Mody E. : Contribuţii la histologia, histochimia şi biochimia limfoganglionilor.

Fazekaş A.. Gyergyay Fr. : *Rolul* limfoganglionului în procesele metabolice.

MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT

69

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 339 p., 16 lei.
C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI şi I. G. DINCULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 96 p., 3,65 lei.
ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429, p., 22,80 lei.
ION ADERCA, MARIUS IANCONESCU, **Culturi de celule în inframicrobiologie**, 319 p. + 3 pl., 18,90 lei.
R. PORTOCALĂ, N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 180 p., 9,90 lei.

LUCRĂRI ÎN CURS DE APARIŢIE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

C. VELICAN şi colab., **Histochimia mucopolizaharidelor.**
C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, vol. I.

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut:

Anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
Anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
Anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
Anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei);
Anul V, 1962, 4 n-re (a 7 lei);
Anul VI, 1963, 1 nr. (a 7 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare
în Bucureşti:
la LIBRĂRIA ACADEMIEI;
LIBRĂRIA „MIHAIL EMINESCU";
LIBRĂRIA NOASTRĂ nr. 17;
LIBRĂRIA NOASTRĂ nr. 4;
în Cluj:
la LIBRĂRIA „CARTEA RUSĂ";
în Iaşi:
la LIBRĂRIA „CARTEA RUSĂ";
în Timişoara:
la LIBRĂRIA NOASTRĂ nr. 1
precum şi la chioşcurile şi magazinele de difuzare a presei din mediul urban.

Se pot comanda şi prin poştă la librăria
„CARTEA PRIN POŞTĂ"
Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie.

Abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate, cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin întreprinderea de stat pentru comerţul exterior „Cartimex" I.S.C.E., str. Aristide Briand nr. 14, sau Căsuţa poştală 134–135, Bucureşti.

I. P. 2. c. 1370

Lei 7

E1330

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

4
ANUL VI
1963

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

4

ANUL VI

1963

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUȘANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacție*.

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacția: BUCUREȘTI, Str. Popovici nr. 20
Tel. 18.43.55 — 17.79.63

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul VI, nr. 4 1963

SUMAR

Pag.

15 ani de la înfiinţarea Academiei R.P.R. 457

D. M. NEEDHAM, Mecanismul contracţiei muşchiului uterin 459

E. MACOVSCHI, Materia vie şi rolul ei în hibridarea plantelor 467

E. MACOVSCHI şi LILICA BOTOŞĂNEANU, Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante 485

C. BODEA, D. OŞIANU şi I. CĂBULEA, Cercetări asupra unor caractere biochimice speciale ale porumbului. III. Manifestarea heterozisului acizilor nucleici la hibrizii simpli între linii consangvinizate de porumb . . 491

AL. BULLA, EUG. PĂUNESCU şi ECATERINA HADÎRCĂ, Dinamica modificărilor compoziţiei mediului de cultură în cursul dezvoltării *Mycobacterium tuberculosis*. I. Variaţii ale pH-ului, componentelor azotate, componentelor fosforate şi substanţelor reducătoare 501

ELENA CRISTEA, C. GURBAN şi ILEANA MITU, Factori de control al vitezei oxidării succinatului în mitocondrii din ficat de şobolan . . . 511

I. KIŢULESCU şi V. BĂLUŢĂ, Date experimentale privind reglarea activităţii proteazelor prin factori fiziologici 523

A. POPESCU-ŞTEFĂNESCU, C. BĂLAN şi M. D. MEZINCESCU, Cercetări comparative asupra unor metode pentru determinarea activităţii xantinoxidazice a ficatului 529

AL. SAUCIUC, Date preliminarii asupra unui nou produs de metabolism la *Penicillium chrysogenum* 539

H. D. SCHELL, Interacţiunea unor săruri cuaternare de amoniu fluorescente cu proteinele musculare 545

MIHAIL ŞERBAN şi DINU TĂNĂSESCU, Cercetarea comparativă a proteinelor sarcoplasmatice din musculatura striată şi netedă 559

C. VILĂU şi MARIA TETEA, Influenţa piridoxalului asupra activării transaminazei mitocondriale hepatice 573

NOTĂ DE LABORATOR

MARGARETA ELIAS, Extragerea unui preparat de ADN din cantităţi reduse de embrioni de grîu 579

CRONICA BIOCHIMIEI DIN R.P.R. 583

RECENZII 585

NECROLOG 603

INDEX ALFABETIC 607

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome VI, nº 4 1963

SOMMAIRE

Page

Le 15e anniversaire de l'Académie de la R.P.Roumaine 457

D. M. NEEDHAM, Le mécanisme de la contraction du muscle utérin . . . 459

E. MACOVSCHI, La matière vivante et son rôle dans l'hybridation des plantes 467

E. MACOVSCHI et LILICA BOTOŞĂNEANU, Méthode du fendage pour les recherches biochimiques comparatives sur des plantes 485

C. BODEA, D. OŞIANU et I. CĂBULEA, Recherches sur certains caractères biochimiques spéciaux du maïs. III. Manifestation de l'hétérosis des acides nucléiques chez les hybrides simples issus de lignées consanguines de maïs 491

AL. BULLA, EUG. PĂUNESCU et ECATERINA HADÎRCĂ, Dynamique des modifications de la composition du milieu de culture au cours du développement du *Mycobacterium tuberculosis*. I. Variations du pH, des composants azotés et phosphorés et des substances réductrices 501

ELENA CRISTEA, C. GURBAN et ILEANA MITU, Facteurs de contrôle de la vitesse d'oxydation du succinate dans les mitochondries du foie de rat 511

I. KIŢULESCU et V. BĂLUŢĂ, Données expérimentales concernant le réglage de l'activité des protéases par des facteurs physiologiques 523

A. POPESCU-ŞTEFĂNESCU, C. BĂLAN et M. D. MEZINCESCU, Recherches comparatives sur deux méthodes pour la détermination de l'activité xanthinoxydasique du foie 529

AL. SAUCIUC, Données préliminaires sur un nouveau produit métabolique du *Penicillium chrysogenum* 539

H. D. SCHELL, Interaction de quelques sels quaternaires d'ammonium fluorescents avec les protéines musculaires 545

MIHAIL ŞERBAN et DINU TĂNĂSESCU, Etude comparée des protéines sarcoplasmatiques des musculatures striée et lisse 559

C. VILĂU et MARIA TETEA, Influence du pyridoxal sur l'activation de la transaminase mitochondriale hépatique 573

NOTES DE LABORATOIRE

MARGARETA ELIAS, Extraction d'une préparation d'ADN à partir de quantités réduites d'embryons de blé 579

CHRONIQUE DE LA BIOCHIMIE DANS LA R.P.R. 583

COMPTES RENDUS 585

NÉCROLOGE 603

INDEX ALPHABÉTIQUE 607

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том VI, № 4 1963

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

15 лет со дня основания Академии РНР 457
Д. М. НИДГАМ, Механизм сокращения маточной мышцы 459
Е. МАКОВСКИЙ, Живая материя и ее роль в гибридизации растений . 467
Е. МАКОВСКИЙ и ЛИЛИКА БОТОШЭНЯНУ, Метод расщепления растений при сравнительных биохимических исследованиях. 485
К. БОДЯ, Д. ОШИАНУ и И. КЭБУЛЯ, Исследование некоторых особых биохимических признаков кукурузы. Сообщение III. Явление гетерозиса нуклеиновых кислот у простых гибридов между односортными линиями кукурузы 491
А. БУЛЛА, Е. ПЭУНЕСКУ, ЕКАТЕРИНА ХАДЫРКА, Динамика изменений состава питательной среды при развитии *Mycobacterium tuberculosis*. Сообщение I. Вариации pH, азотистых компонентов, фосфористых компонентов и восстановительных веществ 501
ЕЛЕНА КРИСТЯ, К. ГУРБАН и ИЛЯНА МИТУ, Контрольные факторы скорости окисления сукцината в митохондриях печени крысы . . 511
И. КИЦУЛЕСКУ и В. БЭЛУЦЭ, Экспериментальные данные по вопросу регулирования деятельности протеаз при помощи физиологических факторов 523
А. ПОПЕСКУ-ШТЕФЭНЕСКУ, К. БЭЛАН и М. Д. МЕЗИНЧЕСКУ, Сравнительные исследования в области методов определения деятельности ксантиноксидазы печени 529
А. САУЧУК, Предварительные данные относительно новых продуктов метаболизма 539
Г. Д. ШЕЛЛ, Взаимодействие между некоторыми четвертичными флюоресцентными солями аммония и мышечными протеинами 545
МИХАЙ ШЕРБАН и ДИНУ ТЭНЭСЕСКУ, Сравнительное исследование протеинов саркоплазмы поперечнополосатой и гладкой мускулатуры 559
К. ВИЛЭУ и МАРИЯ ТЕТЯ, Влияние пиридоксала на деятельность трансаминазы митохондрий печени 573

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАМЕТКИ

МАРГАРЕТА ЭЛИАС, Извлечение препарата дезоксирибонуклеиновой кислоты из ограниченных количеств зародыша пшеницы 579

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 583

РЕЦЕНЗИИ 585

НЕКРОЛОГ 603

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ 607

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

15 ANI DE LA INFIINȚAREA ACADEMIEI R.P.R.

Înființarea Academiei R.P.R., în 1948, a deschis biochimiei romînești perspective noi de dezvoltare. O dată cu înființarea Academiei, s-a organizat și un colectiv de cercetare biochimică, iar în decembrie 1950 s-a hotărît transformarea acestuia în primul Institut de biochimie din țara noastră. Inaugurarea lui a avut loc la 21 martie 1952.

De atunci au trecut 15 ani. Institutul de biochimie s-a dezvoltat, tinerele cadre s-au specializat în diversele ramuri ale biochimiei. Marea lor majoritate și-au ridicat calificarea prin aspirantură, iar multora dintre ei li s-a dat posibilitatea să facă schimburi de experiență cu biochimiștii din alte țări, în special U.R.S.S., R. D. Germană, R. S. Cehoslovacă și R. P. Bulgaria.

În momentul de față, tematica de cercetare a Institutului se axează pe două direcții fundamentale și anume : biochimia hibridării la plante și cercetarea bazelor biochimice ale excitabilității materiei vii, mai ales a musculaturii. În acest cadru, se efectuează diferite investigații privind biochimia acizilor nucleici, translocația substanțelor nutritive în plante, interacțiunea dintre metabolismul vegetal și enzimele introduse în plante, crioproteinele vegetale, proteinele și biochimia substanțelor musculare, relațiile dintre enzime și formațiunile corpusculare intracelulare etc.

Institutul este înzestrat cu aparatură modernă și cu suficiente mijloace proprii de laborator, în vederea desfășurării muncii de cercetare, iar pentru verificarea și aplicarea în practică a rezultatelor obținute s-au realizat legături de colaborare cu institutele departamentale și de învățămînt superior. Astfel, cercetările din domeniul biochimiei hibridării plantelor se efectuează în colaborare cu Institutul de cercetări horticole, ale cărui stațiuni experimentale din București-Băneasa, Blaj, Bistrița, Odobești, Drăgășani etc. ne dau tot sprijinul pentru efectuarea cercetărilor pe plante legumicole, pe viță de vie și pe pomi fructiferi; cu Institutul de cercetări pentru cultura cerealelor de la Fundulea se colaborează în cercetări pe porumb; se colaborează de asemenea cu Institutul de medicină veterinară din București în unele probleme de imunochimie etc.

Institutul de biochimie întreține legături cu o serie de oameni de știință și institute de specialitate de peste hotare. Astfel, se colaborează cu Comisia internațională de chimia și biochimia acizilor nucleici de la Praga, cu Institutele de biochimie din Moscova și Kiev,

cu Institutul de medicină experimentală din Leningrad, cu Institutul pentru creşterea plantelor din Sofia şi altele.

Cercetările efectuate în cadrul Institutului au permis conturarea unor concepţii noi privind natura şi structura materiei vii, translocaţia substanţelor în organismul vegetal; a fost descoperită prezenţa şi s-a arătat importanţa crioproteinelor vegetale în germinarea diferitelor seminţe; au fost stabilite condiţiile de izolare şi purificare a unor enzime necesare zootehniei şi industriei alimentare, ca: hialuronidaza, poligalacturonaza ş. a.; s-au cercetat proteinele din creier şi muşchi, s-a descoperit o serie de fenomene şi fapte noi cu privire la biochimismul fosfocreatinei musculare; s-a cercetat localizarea diferitelor enzime pe formaţiunile corpusculare intracelulare atît la animale, cît şi la plante.

De mare importanţă este faptul că, datorită dezvoltării cercetărilor biochimice, s-a hotărît ca, începînd din anul 1958, Institutul să editeze prima revistă de biochimie din ţara noastră, şi anume „Studii şi cercetări de biochimie". În scurt timp, revista a devenit binecunoscută atît în ţară cît şi în străinătate, dovadă că specialiştii străini, ca acad. A. V. Palladin din Kiev, dr. D. Needham din Anglia, prof. S. Curri din Italia şi alţii, au trimis spre publicare lucrările lor. Biblioteca Institutului primeşte, în schimbul revistei, 222 de titluri de reviste străine de specialitate, din 47 de ţări.

Astfel, datorită condiţiilor create de partid şi de guvernul ţării noastre, pentru dezvoltarea cercetărilor biochimice, cercetătorii Institutului de biochimie caută să răspundă sarcinilor trasate de Congresul al III-lea al P.M.R., contribuind prin munca lor la desăvîrşirea construcţiei socialismului în ţara noastră.

MECANISMUL CONTRACȚIEI MUȘCHIULUI UTERIN*)

DE

D. M. NEEDHAM

Datorită lucrărilor lui Huxley și Hanson [1] se știe că, în mușchii scheletici, filamentele constitutive ale fibrei musculare sînt de două feluri, fiind compuse din două proteine, miozina și actina, dispuse într-un mod regulat. Acestea se pot vedea la micrograful electronic, împreună cu legăturile care se fac între filamentul de miozină și cel alăturat de actină. Complexul dintre miozină și actină este cunoscut sub numele de actomiozină. Toate indicațiile arată că contracția are loc printr-un mecanism de alunecare, legăturile fiind desfăcute și refăcute în mod continuu, astfel încît o parte a filamentului poate aluneca peste cealaltă. Pentru contracția mușchiului este nevoie de energie. Aceasta este procurată prin reacția chimică:

$$ATP \rightarrow ADP + H_3PO_4$$

iar Engelhardt și Liubimova [2] au descoperit în 1939 că actomiozina este nu numai proteina structurală a celulei musculare, ci și o enzimă specifică care îndeplinește tocmai reacția de mai sus. Astăzi se crede că, în centrii activi ai filamentelor, probabil în punctele unde se fac legăturile dintre cele două tipuri de proteine, ATP-aza intră în activitate atunci cînd mușchiul este stimulat, dînd naștere energiei necesare. ATP trebuie să difuzeze continuu spre acești centri activi. Cînd, prin această acumulare, concentrația ATP-azei se ridică, legăturile se desfac și astfel apare posibilitatea alunecării. Apoi se formează noi legături prin defosforilarea ATP de către ATP-aze. Această refacere și desfacere a legăturilor trebuie să ne-o imaginăm ca pe un proces foarte rapid, care are loc în timpul contracției. Cînd mușchiul este relaxat, activitatea ATP-azei este oprită printr-un mecanism special; în acest timp concentrația mare a ATP împiedică formarea legăturilor.

*) Traducerea din limba engleză a fost efectuată de Cecilia Șelariu, cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

Cînd mușchiul scheletic se extrage cu o soluție tamponată de KCl 0,5 M și extractul se diluează cu apă, se obține un precipitat; acesta este format dintr-un complex al celor două proteine — aproximativ 4 părți de miozină, combinate cu o parte actină. Un grup de cercetători de la Cambridge, conduși de soțul meu [3], au arătat pentru prima dată că dacă la soluția acestui complex de proteine în 0,5 M KCl se adaugă ATP, are loc o mare scădere a vîscozității. Szent-Györgyi [4] și Straub [5] au găsit că această scădere se datorește disocierii complexului actomiozinic în actină și miozină. Precipitatul obținut prin diluarea extractului de mușchi scheletic consistă aproape în întregime din actomiozină, poate și cu puțină miozină. După adăugarea ATP, el conține miozină și actină; vîscozitatea se datorește acum mai ales miozinei, deoarece, comparativ, există mai puțină actină. Concentrația unei proteine fibrilare (ca aceea cu care avem de-a face aici) este proporțională cu logaritmul vîscozității relative a soluției sale; cantitatea de actomiozină dintr-o soluție poate fi astfel determinată cantitativ, prin măsurarea scăderii logaritmului vîscozității relative după adăugare de ATP.

Cînd s-a început studiul mușchiului neted uterin, prin lucrarea lui Csapó din 1948 [6] era natural să se caute aceleași proteine, miozina și actina; era de așteptat ca asocierea lor să formeze actomiozina și ca ATP să producă disocierea complexului. Csapó a găsit, în adevăr, că extractul din mușchiul uterin prezintă o scădere a vîscozității după adăugare de ATP, și a dedus prezența actomiozinei. Această scădere devine cu atît mai mare cu cît sarcina înaintează. Mai mult, cînd extractul se diluează la 0,04 M, se formează un precipitat, iar soluțiile acestui precipitat prezintă de asemeni o scădere a vîscozității. Csapo a calculat cantitatea de actomiozină prezentă, din scăderea vîscozității după adăugarea ATP, și cantitatea de miozină prezentă, din valoarea vîscozității după adăugarea ATP. Pentru aceste calcule au fost necesare două presupuneri : 1) că actomiozina uterină se comportă din punct de vedere cantitativ în același mod ca actomiozina mușchiului scheletic; 2) că nici o altă proteină capabilă să afecteze semnificativ vîscozitatea, în afară de actomiozină și miozină, nu este prezentă în precipitatul obținut prin diluarea extractului de uter.

Vom examina acum aceste două presupuneri, dar trebuie spus de la început că prima presupunere s-a dovedit a fi justificată, pe cînd cea de-a doua nu.

Pentru a face comparația actomiozinei din mușchiul scheletic cu cea din uter, în lucrarea cu dr. J. M. Williams am obținut, din extracte de uter, actomiozină purificată și am găsit că aceasta are aceeași mobilitate electroforetică ca și actomiozina din mușchiul scheletic. Ea are de asemenea aceeași vîscozitate relativă ca și actomiozina mușchiului scheletic și aceeași scădere a vîscozității sub acțiunea ATP. Observații similare au fost făcute de către Huys [7]. Aceasta arată că miozina for-

mată prin disociere trebuie să aibă o vîscozitate similară cu aceea a miozinei mușchiului scheletic. Și în adevăr așa este : noi am preparat miozină din actomiozina obținută din uter și am găsit că are o vîscozitate normală și că reacționează în mod obișnuit cu actina din mușchiul scheletic. Rezultate similare au fost obținute de Nagy (vezi Csapó [8]). Și Cohen [9] a preparat recent miozină tipică din actomiozină uterină. La fel, noi am obținut actină din mușchiul uterin prin metoda clasică întrebuințată pentru mușchiul scheletic. Această actină uterină era similară cu actina din mușchiul scheletic prin mobilitatea sa electroforetică, proprietățile vîscozimetrice și proprietatea de a reacționa cu miozina. De asemenea și prin viteza sa de sedimentare : o lucrare mai veche a lui Csapó și colaboratori [10] a arătat că extractele de uter gravid conțin o substanță cu viteză mare de sedimentare, asemănătoare cu aceea a actomiozinei scheletice. După adăugare de ATP, această substanță dispare și este înlocuită de o substanță cu o viteză de sedimentare mai mică, asemănătoare aceleia a miozinei mușchiului scheletic. Aceste observații au fost transpuse recent pe bază cantitativă de către Kominz și Saad [11]. Reiese clar că proteinele contractile ale celor două tipuri de mușchi sînt foarte asemănătoare în proprietățile lor fizico-chimice.

Trecem acum la cea de a doua presupunere : dacă în precipitatele de diluare obținute din mușchiul uterin mai sînt prezente și alte substanțe decît actomiozina. Împreună cu dr. Williams, am găsit că într-un precipitat de diluare obținut din uter gravid (chiar după două redizolvări și reprecipitări, — procedeu întrebuințat pentru purificarea actomiozinei mușchiului scheletic) scăderea vîscozității în prezența ATP arată că numai aproximativ jumătate din proteine este constituită din actomiozină ; în precipitatele de diluare obținute în același fel din uter negravid, numai aproximativ 25% era actomiozină. În aceste precipitate am determinat specific și miozina, adăugînd actină pentru a o combina cu ea, și apoi ATP. În toate precipitatele am găsit foarte puțină miozină liberă. Ce este, atunci această proteină diferită de actomiozină ?

După cum am spus, ea nu poate fi separată de actomiozină prin redizolvări și reprecipitări repetate la 0,04 M. Ea poate fi separată însă dacă actomiozina este precipitată la 0,3 M. În acest caz, în soluție rămîne multă proteină, care se dovedește a avea o vîscozitate scăzută și a fi solubilă în apă sau la concentrații saline foarte scăzute. Încă nu se știe dacă tendința ei de a precipita împreună cu actomiozina la diluații mari este un artefact, sau dacă acest fapt indică vreo legătură funcțională cu mecanismul contracției.

Ivanov și colab. [12] au elaborat o altă metodă de studiere a proteinelor acvosolubile asociate cu proteinele insolubile din mușchiul uterin. Mușchiul omogenizat era foarte riguros spălat de patru ori, cu soluții saline foarte diluate. Apoi, mușchiul era extras cu soluție 0,5 M de KCl tamponată. Prin diluare la 0,04 M se forma un precipitat conținînd actomiozină, dar o mare parte din proteina prezentă rămînea în soluție. Noi

am confirmat aceste date. După Ivanov, faptul că aceste proteine solubile nu pot fi separate de cele insolubile pînă ce acestea nu au fost dizolvate în soluții saline înseamnă că în mușchii netezi aceste proteine solubile iau parte la mecanismul contracției. Deoarece aceste proteine, cu toate că apar și în mușchiul scheletic, nu se găsesc totuși aici decît în proporție cu mult mai redusă decît actomiozina, Ivanov mai presupune că ele joacă un rol important în mecanismul tonusului mușchilor netezi.

La mușchii netezi ai nevertebratelor, de exemplu la moluște ca Pecten și stridii, tonusul poate fi foarte ridicat, tensiunea fiind menținută timp îndelungat cu o cheltuială mică de energie. S-a arătat că în filamentele groase ale acestor celule musculare apare o proteină specială, paramiozina. Prin compoziția sa în aminoacizi, paramiozina seamănă cu miozina; este insolubilă în apă, dar dă soluții vîscoase în prezența KCl. Prin injectarea sub formă de vînă subțire a unei soluții de paramiozină într-un volum mare de tampon 0,03 M, se pot forma filamente de paramiozină. Rüegg [13] a arătat că rigiditatea acestor filamente variază după condițiile de pH și concentrația ATP. Aceste rezultate, împreună cu alte date, l-au condus la concepția că, la acești mușchi, în timp ce contracția propriu-zisă depinde de actomiozină, mecanismul prelungirii contracției depinde de schimbări în starea paramiozinei. Un alt punct de vedere este exprimat de Hanson și Lowy [14], care sînt de părere că filamentele de paramiozină ale unui mușchi, cum este cel de stridie, sînt comparabile cu filamentele de miozină ale mușchilor striați ai vertebratelor, avînd cu actina legături comparabile cu legăturile actină-miozină descrise mai sus. Autorii consideră că economia în consumul de energie este realizată printr-o viteză scăzută de desfacere a acestor legături. În orice caz, paramiozina este privită ca jucînd un rol în contracția tonică.

Trebuie remarcat că fenomenul mecanismului contracției prelungite nu prea este limpede în cazul mușchiului neted la mamifere, deși Johnson [15] a arătat că există mai multe tipuri de contracție tonică care nu pot fi asimilate cu ușurință mecanismului contractil activ. În această direcție sînt necesare mult mai multe lucrări. Am căutat paramiozina în mușchiul uterin, atît cu ajutorul microscopului electronic, cît și prin metode biochimice, dar nu am găsit-o. Este destul de greu de înțeles în ce fel proteinele solubile, discutate mai sus, ar putea juca un rol similar. După cîte știu, pînă acum încă nu s-au descris proprietăți care s-ar potrivi acestui rol și va fi foarte interesant să se urmărească rezultatele lucrărilor pe care le continuă grupul lui Ivanov.

În precipitatele de diluare, mai ales în cele de uter negravid, am găsit și cantități mici de colagen solubil în soluții saline, care dă soluții cu vîscozitate ridicată. Aceste rezultate, ca și o bună parte din lucrarea descrisă mai sus, sînt publicate numai într-o formă preliminară [16] și se pregătesc pentru tipar.

Deci, precipitatul de diluare obținut din uter, chiar cînd acesta este gravid, conține numai aproximativ 40—50% actomiozină. S-a arătat însă că, în stare purificată, această actomiozină seamănă foarte mult prin proprietățile sale fizico-chimice cu actomiozina clasică. După cunoștințele noastre actuale, mecanismul contracției uterului depinde de actomiozină, însă este posibil să fie implicate și unele proprietăți oarecum speciale ale actomiozinei mușchiului neted, care vor fi discutate mai departe. Trebuie subliniat faptul că, în mușchiul uterin, cantitatea prezentă este foarte mică în comparație cu aceea din mușchiul scheletic; chiar în uterul gravid se găsește numai 7—10% din cantitatea existentă în mușchiul scheletic.

Trecem acum la problema activității ATP-azice a actomiozinei uterului, amintind că sursa energiei musculare este acțiunea ei asupra ATP. Vom examina mai întîi activitatea actomiozinei mușchiului scheletic, determinată în condiții asemănătoare acelora *in vivo*; adică, la o concentrație salină de aproximativ 0,1 M (cînd actomiozina este solidă, așa cum sînt și fibrilele în celula musculară), la pH 7 și activată de ioni de Mg.

Tabelul nr. 1

Moli de P anorganic liberați/mg N proteic pe minut

	Actomiozină	Actomiozină după tripsină	Acto-H-meromiozină
Mușchi scheletici (activați de Mg sau Ca)	4,5	5,3	10
Uter (activat de Ca)	0,5	3	5,5

Este important de relevat că actomiozina mușchiului scheletic este activată de ionii de Mg (10^{-3} M) și de Ca (10^{-2} M); dar numai scindarea ATP activată de ionii de Mg poate produce energia necesară contracției. Aceasta se poate arăta în felul următor. Fîșii subțiri de mușchi se tratează, după metoda lui Szent-Györgyi, cu 50% glicerol, la —20°, timp de cîteva zile; proteinele solubile și alte substanțe sînt astfel extrase în glicerol și rămîne un fel de schelet de actomiozină al mușchiului. După ce glicerolul se îndepărtează prin spălare, aceste fîșii vor produce scindarea ATP adăugat, în prezența fie a ionilor de Mg, fie a celor de Ca, însă ele se vor contracta la adăugarea ATP numai în prezența Mg [17].

În cazul actomiozinei uterine, practic nu s-a constatat nici o activitate ATP-azică, dacă se folosește ca activator Mg. Cu Ca însă, ca activator, s-a găsit activitatea slabă arătată în tabelul nr. 1 aproximativ o zecime din aceea a actomiozinei scheletice [18]. Această lipsă de activitate în prezența ionilor de Mg poate fi un artefact, datorit unor schimbări produse în proteină prin dizolvarea fibrilelor și reprecipitarea lor. Această presupunere pare a fi verosimilă, datorită următorului fapt: Hasselbach [19] a preparat fîșii glicerinate de mușchi uterin și a găsit, întocmai ca și la mușchii striați, că pentru producerea contracției tre-

buie să se adauge ATP și Mg. Și noi am încercat să preparăm miofibrile din mușchiul uterin, prin omogenizare perfectă urmată de centrifugare diferențială, făcînd tot posibilul să separăm fibrilele de particulele celulare [21]. Rezultatele acestor experiențe preliminare nu sînt satisfăcătoare, pentru că atît particulele celulare cît și nucleii au activitate ATP-azică, iar completa lor separare de fibrile este foarte dificilă. Cu toate acestea, am găsit unele date care arată că fibrilele native pot fi activate de Mg, ca și de Ca. Acesta este un punct important, care necesită noi cercetări.

Este interesant efectul enzimei proteolitice — tripsina — asupra miozinei. Miozina scheletică este desfăcută în două proteine, cunoscute ca meromiozina grea și ușoară, și numai o foarte mică parte a miozinei este degradată la o formă neproteică. Atît întreaga activitate ATP-azică cît și întreaga capacitate de combinare cu actina s-au găsit în meromiozina grea [20]. Tripsina acționează și asupra miozinei uterine, dînd aceiași doi produși [21], în acest caz cu o remarcabilă creștere a activității ATP-azice; în adevăr, această activitate este aproape de același ordin de mărime cu a enzimei scheletice. Se pare că în felul acesta se pun în activitate unii centri activi latenți, așa că se pune întrebarea dacă în unele condiții această intrare în activitate nu s-ar face prin mijloace fiziologice.

Am văzut că mușchiul neted uterin are un conținut scăzut în actomiozină; concentrația surselor de energie — ATP, creatinfosfat și glicogen — este de asemenea scăzută. Atît sursele de energie cît și actomiozina cresc o dată cu înaintarea sarcinei [22]. Csápo și Corner [23] au arătat pe fîșii de mușchi uterin că producerea tensiunii (în estru, după ovariectomie și după ovariectomie cu tratament de estrone) poate fi corelată cu conținutul de actomiozină determinat, pentru aceste stări, în experiențe anterioare. La naștere, cînd este nevoie de un mare efort al mușchiului uterin, se înlătură mecanismul de apărare al progesteronei (care micșorează eficiența stimulilor prin descreșterea activării și transmisiei); de asemenea, datorită pierderii lichidului amniotic și redistribuției conținutului uterin, fasciculele mușchiului relaxat pot să se scurteze pînă la aproximativ lungimea de repaus, la care capacitatea lor de tensiune este maximă [24].

Cîteva cuvinte și despre mecanismul contracției mușchiului neted la mamifere, studiat cu microscopul electronic de către colaboratorul meu Shoenberg [25]. În secțiunile longitudinale și transversale se poate vedea numai un singur fel de filamente. Acestea sînt dispuse paralel unul față de altul de-a lungul axei longitudinale a celulei și au un diametru de 50—80 angströmi, aproape la fel ca filamente de actină. Pînă în prezent nu știm dacă aceste filamente sînt formate toate din actină sau dacă unele sînt formate din actină și altele din miozină, deși ele toate au un aspect asemănător. Singurele structuri de alt gen, observate în

legătură cu filamentele și care pot fi puncte de fixare, se prezintă ca niște corpi denși, distribuiți frecvent, dar neregulat.

Examinarea în secțiune transversală a mușchiului glicerinat de *Taenia coli*, contractat la jumătatea lungimii, s-a făcut pe secțiuni tăiate la nivel nuclear, așa încît suprafețele observate să corespundă suprafețelor mușchilor relaxați. Pe materialul examinat pînă acum s-a observat că diferența dintre mărimea suprafeței celulelor relaxate și aceea a celulelor contractate era mai mare decît variația individuală la fiecare grup în parte, suprafața celulelor contractate fiind cu mult mai mare decît suprafața celulelor relaxate. Calculele preliminare făcute pe filamentele acestor suprafețe arată că diametrul filamentelor nu crește semnificativ, însă numărul lor total este mult mai mare în celulele contractate decît în cele relaxate. Aceste observații sugerează că în mușchii netezi ai vertebratelor intervine o formă de mecanism de alunecare, ca și în alte tipuri de mușchi.

Acesta nu poate fi însă singurul mecanism. Astfel, Laszt a arătat recent, că mușchii netezi ai pereților arteriali conțin o actomiozină care poate fi extrasă cu soluții saline foarte diluate (0,05 M), dacă este prezentă și o cantitate mică de ATP. O proteină similară a fost găsită de Huys [26] în mușchiul uterin. Se pare că această formă de actomiozină poate fi transformată ușor în forma clasică cu ajutorul soluțiilor cu putere ionică mai mare. Laszt și Hamoir [27] au presupus că această formă nouă (pe care o numesc tonoactomiozină) poate fi legată de tonusul muscular. Ei o descriu ca fiind prezentă într-o formă dispersă, ca o rețea labilă, în sarcoplasma mușchilor relaxați; schimbările intervenite în mediul ionic pot duce însă, după aceiași autori, la formarea unei rețele mai rigide, și ca urmare, la contracția celulei. Această „tonoactomiozină" este foarte interesantă și noi am confirmat unele din proprietățile ei particulare. Din aceste experiențe a rezultat că o parte destul de mare din actomiozina totală se poate extrage sub formă de tonoactomiozină.

Din cele relatate mai sus reiese limpede că, cu toată multitudinea de lucrări apărute în ultimii 15 ani, rămîn încă foarte multe de descoperit în biochimia contracției mușchiului neted.

Departamentul de Biochimie,
Universitatea din Cambridge,
Anglia

Prezentată la redacție la 14 iulie 1963

BIBLIOGRAFIE

1. HUXLEY H. E., HANSON J., Nature, **173**, 973 (1954).
HANSON J., HUXLEY H. E., *Symposium of the Society of Experimental Biology*, *9*, 1955.
2. ENGELHARDT W. A., LIUBIMOVA M. N., Nature, 144, 668 (1939).
3. DAINTY M., KLEINZELLER A., LAWRENCE A. S. C., MIALL M., NEEDHAM J., NEEDHAM D. M., SHEN S. C., J. gen. Physiol., **27**, 355 (1944).
4. BANGA I., SZENT-GYÖRGYI A., Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, *1*, 5 (1941–42).

5. STRAUB F. B., Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, *2*, 3 (1942).
6. CSAPÓ A., Nature, **162**, 218, (1948); Acta Physiol. Scand., **19**, 100 (1949); Amer. J. Physiol., **160**, 46 (1950).
7. HUYS J., Arch. Intern. Physiol. et Biochim., **68**, 545 (1960).
8. CSAPÓ A., Ann. N.Y. Acad. Sci., **75**, 790 (1959).
9. COHEN C., LOWEY S., KUCERA J., J. biol. Chem., **236**, PC 23 (1961).
10. NALSLUND, SNELLAMN O., CSAPÓ A., ERDÖS T., Acta Obstet. Gynecol. Scand., **29**, 291 (1949—50).
11. KOMINZ D. R., SAAD F., Fed. Proc., **15**, 112 (1956).
12. IVANOV I. I., MIROVICH N. I., MOISSEJEVA V. F., PARSHINA E. A., TUKASHINSKY S. E., YURIEV V. A., ZHAKOVA Z. N., ZINOVIEVA I. P., Acta Physiol. Hung., **26**, 7 (1959).
IVANOV I. I., MIROVICH N. I., ZHAKOVA Z. N., TUKACINSKY S. E., Biochemistry (Leningr.), **27**, 94 (1962).
13. RÜEGG J. C., Proc. Roy. Soc. (London), B. **154**, 224 (1961).
14. HANSON J., LOWY J., Proc. Roy. Soc. (London), B. **154**, 173 (1961).
15. JOHNSON W. H., Physiol. Rev., **42**, Suppl. 5, 113 (1962).
16. NEEDHAM D. M., Physiol. Rev., **42**, Suppl. 5, 88 (1962).
17. BENDALL J. R., Personal communication; PORTZEHL H., Biophys. biochim. Acta, **14**, 195 (1954).
18. NEEDHAM D. M., CAWKWELL J. M., Biochem. J., **63**, 337 (1956).
19. HASSELBACH W., LEDERMAIR O., Arch. ges. Physiol. Pflügers, **267**, 532 (1958).
20. SZENT-GYÖRGYI A. G., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 305 (1953).
21. NEEDHAM D. M., WILLIAMS J. M., Biochem. J., **73**, 171 (1959).
22. CRETIUS K., Z. für Gebursthilfe u. Gynekologie, **149**, 113 u. 131 (1957).
23. CSAPÓ A., CORNER G. W., Science, **117**, 162 (1953).
24. CSAPÓ A., In *Modern Trends in Obstetrics and Gynecology*, Publ. Butterworth, London, 1955, p. 20.
25. SHOENBERG C. F., J. Biophys. Biochem. Cytol., *4*, 609 (1958).
SHOENBERG C. F., *Proc. 5-th Intern. Congress of Electron Microscopy*, 1958, M 8.
26. HUYS J., Arch. Intern. Physiol. et Biochem., **69**, 677 (1961).
27. LASZT L., HAMOIR F., Biophys. Biochim. Acta, **50**, 430 (1961).

MATERIA VIE ŞI ROLUL EI ÎN HIBRIDAREA PLANTELOR

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Problema hibridării plantelor prezintă, pentru practica agricolă, o însemnătate deosebită. În adevăr, prin hibridare se pot obține noi soiuri superioare de mare productivitate, iar hibrizii, mai ales cei din prima generație, prezintă adesea fenomenul de heterozis, adică o sporire puternică a vigurozității, vitalității și productivității. Din aceste motive, hibridarea poate fi considerată ca cea mai importantă metodă de ameliorare a plantelor.

Pe lîngă importanța practică, hibridarea plantelor prezintă și o mare însemnătate teoretică. Cercetările îndreptate spre descoperirea bazelor biochimice ale hibridării pot duce la explicarea fenomenelor eredității și deschid posibilități tot mai eficiente de dirijare a dezvoltării însușirilor și caracterelor organismului vegetal în folosul producției.

Pentru biochimie, domeniul hibridării plantelor reprezintă un vast cîmp de activitate creatoare, dat fiind că fenomenele care duc la schimbarea naturii plantelor și la formarea plantelor cu însușiri noi, condiționate de modificarea eredității, sînt legate de modificarea metabolismului organismului vegetal, și deci de modificarea diferitelor procese biochimice care se produc în plante.

Conținutul și desfășurarea cercetărilor biochimice în problema hibridării plantelor depinde în mare măsură de modul cum este privită materia din care sînt alcătuite organismele vii. Or, conform părerilor actuale, protoplasma — considerată ca materie vie — conține o mulțime de componente bine definite din punct de vedere chimic. „Componentele chimice ale protoplasmei, cunoscute pînă acum și luate la un loc, reprezintă aproape întreaga masă a substanței plasmatice, așa că nu rămîne loc pentru vreun alt fel de componente, încă necunoscute, care ar putea juca în protoplasmă un rol important" [1]. „Proteinele ca atare (în sensul chimic) reprezintă componenta cea mai importantă a

materiei vii. Dar, pe lîngă proteine, din compoziția materiei vii fac parte și alți compuși organici și neorganici. Printre componentele neproteice ale materiei vii, un rol însemnat au lipoizii, acizii nucleici și derivații lor, precum și hidrații de carbon. Printre componentele neorganice, importanță mare au diferitele săruri, precum și apa" [2].

Din moment ce se admite că protoplasma vie din organisme conține diferite componente chimice și, din moment ce se constată că componentele chimice izolate ale protoplasmei nu manifestă fenomenele vieții, deosebirea dintre viu și neviu se caută la nivelul reacțiilor dintre diferitele componente chimice ale protoplasmei, adică la nivelul transformărilor chimice care se produc în ființele vii. Se consideră că viața este condiționată de „zecile și sutele de mii de reacții chimice care se săvîrșesc în protoplasmă și în ansamblul lor constituie metabolismul" [3 *a*]. De aceea, se afirmă că protoplasma sau materia vie este „o formațiune complicată care conține proteine și a cărei condiție esențială și necesară de existență este autoreînnoirea continuă, adică metabolismul" și că „însușirile vieții le posedă numai materia vie — protoplasma — întreagă, și nu componentele ei separate" [2].

Definiția de mai sus a metabolismului este prea sumară și nu scoate suficient în evidență deosebirea dintre chimismul materiei cuprinse în organismele vii și al celei din afara organismelor. Mai mult, „din punct de vedere chimic asimilația și dezasimilația, întregul schimb biologic de substanțe, reprezintă un ansamblu complex, format dintr-un număr enorm de reacții foarte simple și relativ uniforme. Acestea sînt reacțiile de oxidare, reducere, hidroliză, fosforoliză, condensări aldolice, transferul grupărilor aminice și metilice etc., bine cunoscute chimiștilor și ușor reproductibile în afara organismului viu, în condiții de laborator. Dar, la nici una din ele nu se observă vreo manifestare specifică vieții" [3 *b*]. De aceea, se precizează că metabolismul se deosebește de chimismul obișnuit prin faptul că toate reacțiile chimice ale metabolismului „nu numai că sînt riguros coordonate în timp, nu numai că se îmbină armonios într-o ordine unitară, dar însăși această ordine este orientată spre autoconservarea și autoreproducerea continuă a întregului sistem viu, într-o concordanță cît mai riguroasă cu condițiile mediului ambiant" [3 *a*]. Se mai afirmă că toate reacțiile chimice care alcătuiesc metabolismul se realizează în condițiile „adaptării structurii diferitelor părți ale sistemului la îndeplinirea cît mai perfectă și mai coordonată a acelor funcții necesare vieții, pe care părțile respective le înfăptuiesc în cadrul ansamblului sistemului" [3 *a*]. Astfel „ceea ce este specific pentru organizarea protoplasmei în timp, pentru schimbul biologic de substanțe, este coordonarea riguroasă, îmbinarea armonioasă a reacțiilor, care nu se succed întîmplător ci într-o ordine foarte precisă, guvernată de legi, formînd lanțuri drepte și ramificate, precum și cicluri închise de transformări chimice, ... ca la rețeaua de reacții ce se desfășoară în sistemele deschise" [3 *b*].

Ideile de mai sus duc la următoarea interpretare a fenomenelor eredității: „... pentru modificarea naturii eredității organismelor ve-

getale este necesar să se modifice metabolismul acestora ... În cursul normal al metabolismului sînt posibile anumite devieri, provocate de schimbarea condiţiilor mediului înconjurător... În general, astfel de devieri nu parvin să tulbure nici coordonarea chimică a transformării substanţelor şi nici coordonarea energetică respectivă. Totuşi, în cursul metabolismului se pot produce şi acele devieri, de asemenea determinate de acţiuni externe, care ... prin tulburări ale raporturilor metabolice vechi, duc la crearea de noi raporturi, la un nou tip de metabolism coordonat, implicit la modificarea ereditară a diverselor particularităţi ale organismului. Din punctul de vedere al biochimiei, ereditatea zdruncinată poate fi explicată tocmai prin acea tulburare a coordonării metabolismului care ... poate să permită coordonarea metabolismului pe o nouă bază. Privit de pe aceste poziţii, caracterul conservator al eredităţii constă în gradul de stabilitate al unui anumit mod legic de transformare a substanţelor la care s-a ajuns în procesul evoluţiei îndelungate a organismelor" [4].

Rezultă că diferitele fiinţe vii se deosebesc între ele prin particularităţile metabolismului lor şi că transformarea unei fiinţe cu anumite însuşiri într-o altă fiinţă cu alte însuşiri implică modificarea metabolismului ei. De aceea, cercetările biochimice în domeniul hibridării plantelor urmăresc descoperirea acelor particularităţi ale proceselor biochimice, precum şi ale naturii şi structurii componentelor chimice din organismul vegetal, care sînt caracteristice plantelor partenere la hibridare şi hibrizilor respectivi. Se spera că prin cunoaşterea acestor particularităţi, precum şi a modului lor de apariţie, se va ajunge la descifrarea mecanismului biochimic al hibridării şi eredităţii, ceea ce va permite elaborarea celor mai potrivite şi eficace metode pentru dirijarea dezvoltării caracterelor ereditare utile la plante.

Cu toate că cercetările biochimice, efectuate de pe poziţiile acestor consideraţii asupra naturii materiei din care sînt alcătuite organismele vii, au adus şi aduc contribuţii preţioase la cunoaşterea diferitelor aspecte ale biochimismului hibridării şi au prilejuit o serie de descoperiri importante în acest domeniu, totuşi ele încă nu au lămurit pe deplin mecanismul biochimic al acestui proces biologic atît de important. De aceea, fără a subestima valoarea rezultatelor obţinute pînă acum şi importanţa diferitelor ipoteze şi teorii bazate pe consideraţiile actuale despre materia cuprinsă în organismele vii, socotim că încercările de elaborare a unor noi ipoteze bazate eventual pe alte consideraţii asupra acestei materii, pot fi utile pentru aprofundarea problemei eredităţii în general şi problemei hibridării în special. În consecinţă, vom încerca să formulăm o nouă ipoteză de lucru cu privire la materia din care sînt alcătuite plantele vii şi la rolul ei în hibridare, pornind de la unele consideraţii noi asupra naturii acestei materii, publicate într-o lucrare anterioară [5], [6], [7].

După cum se ştie, protoplasma, adică materia vie în înţelesul curent al cuvîntului, se deosebeşte fundamental de materia nevie printr-o serie de însuşiri caracteristice, ca: metabolism, iritabilitate, reproductibilitate, mobilitate, ereditate şi altele, care îi sînt specifice, precum şi prin stările de excitaţie, inhibiţie şi altele, care nu se întîlnesc la materia

nevie. Mai mult : manifestările materiei vii — protoplasmei — oglindesc un stadiu superior de organizare, urmînd legi biologice cu conținut propriu. Faptele menționate arată că între materia vie și materia nevie obișnuită există o deosebire profundă.

Cu toate acestea, protoplasma vie conține diferite componente chimice, ca : glucoză, aminoacizi, săruri și altele, care nu sînt vii și care pînă la o anumită limită pot părăsi protoplasma, de exemplu prin exosmoză, fără ca viața acesteia să înceteze. Prin urmare, se poate admite că protoplasma este formată din două feluri distincte de materie : materia vie propriu-zisă, datorită căreia protoplasma prezintă însușirile și stările specific biologice amintite, și alta, materia nevie, alcătuită din diferiți compuși chimici organici și anorganici obișnuiți care, împreună cu materia vie, condiționează viața protoplasmei. Rezultă că pentru lămurirea deosebirii dintre materia vie și cea nevie, precum și pentru stabilirea rolului materiei vii în diferite fenomene biologice, trebuie luată în considerație nu protoplasma ca atare, în totalitatea ei, ci materia vie propriu-zisă cuprinsă în protoplasmă. Pentru evitarea confuziilor de nomenclatură, termenul de materie vie va fi folosit în această lucrare în sensul materiei vii propriu-zise, iar protoplasma va fi considerată ca un ansamblu viu, aflat la baza vieții și alcătuit din cele două materii coexistente : materia vie și cea nevie.

Dacă admitem că protoplasma vie, pe lîngă diferiți compuși chimici cunoscuți, conține materia vie, imediat se pune întrebarea cum este această materie, din ce este formată și de ce nu a fost cunoscută și cercetată pînă acum?

În această privință, chiar de la început se pot face unele precizări :

Din moment ce materia vie se formează prin asimilația materiei nevii, adică a diferiților compuși chimici cunoscuți, și prin dezasimilație se transformă în materie nevie, adică tot în compuși chimici cunoscuți, înseamnă că materia vie este alcătuită din aceleași particule materiale din care este formată și materia nevie. Cum însușirile materiei depind de structura ei și cum însușirile biologice ale protoplasmei se deosebesc fundamental și calitativ de însușirile materiei nevii, înseamnă că structura materiei vii cuprinse în protoplasmă se deosebește fundamental și calitativ de structura materiei nevii. De aici rezultă că asimilația, adică transformarea substanțelor chimice obișnuite în materie vie, constă în integrarea acestor substanțe într-o structură cu totul specială, aflată pe o treaptă superioară de organizare, în comparație cu structura și organizarea materiei nevii. Prin integrarea în această structură specială, substanțele asimilate încetează a fi ceea ce au fost și participă într-un mod nou la manifestarea însușirilor și stărilor materiei vii în a cărei structură s-au încadrat. Prin urmare, la alcătuirea materiei vii participă tot compușii chimici obișnuiți, care însă sînt astfel asamblați în cadrul noii structuri caracteristice și cu totul speciale, încît prin această structură devine posibilă manifestarea însușirilor specifice ale materiei vii. Dat fiind că fenomenele vieții, condiționate de existența materiei vii, nu se produc după moarte, înseamnă că, o dată cu moartea protoplasmei, materia vie încetează să existe. Or, conform analizelor chimice, mate-

rialul biologic care a încetat să trăiască este alcătuit exclusiv din compuşi chimici obişnuiţi. Înseamnă că o dată cu moartea protoplasmei materia ei vie se dezagregă, transformîndu-se în diferiţi compuşi chimici. Dacă admitem că materia vie există numai datorită interacţiunii şi interdependenţei funcţionale cu materia nevie cu care coexistă în protoplasmă, ajungem la concluzia că materia vie nu poate fi izolată din protoplasmă şi obţinută în stare pură, căci în momentul separării ei de materia nevie interacţiunea încetează şi materia vie se dezagregă. În fine, dacă materia vie şi cea nevie se află în relaţii de continuă transformare reciprocă, rezultă că în protoplasma vie cele două materii se întrepătrund, căci numai în felul acesta pot fi asigurate acele legături indisolubile între cele două feluri de materie şi acele transformări ale lor reciproce care asigură şi caracterizează viaţa protoplasmei.

Pe marginea precizărilor de mai sus se pot face unele consideraţii cu privire la transformările de ordin chimic care se produc în cele două materii întrepătrunse, precum şi la corelaţiile dintre aceste transformări.

Este evident că în protoplasmă, la nivelul materiei nevii, reacţiile biochimice se produc conform legilor chimice cunoscute. De altfel, aceste reacţii pot fi reproduse şi în afara protoplasmei, *in vitro*. Este probabil că şi la nivelul materiei vii se produc transformări diferite, care se deosebesc însă de reacţiile chimice obişnuite, deoarece se produc în condiţiile unei structuri speciale, profund deosebite de aceea a materiei nevii. Se poate admite că datorită întrepătrunderii celor două materii, şi deci datorită contactului intim dintre ele, reacţiile biochimice dintre substanţele care alcătuiesc materia nevie pot induce transformări de ordin chimic în regiunile învecinate ale materiei vii, şi invers : diferite transformări intervenite într-o porţiune a materiei vii se pot repercuta asupra biochimismului care se manifestă în materia nevie din imediata vecinătate. Tot întrepătrunderea celor două feluri de materie este aceea care asigură desfăşurarea fenomenelor metabolice fundamentale de asimilaţie, adică de transformare a materiei nevii în cea vie, şi de dezasimilaţie, adică de transformare a materiei vii în cea nevie. Rezultă că trebuie făcută o distincţie între *biochimism*, care cuprinde toate procesele chimice care se produc la nivelul materiei nevii din protoplasmă, şi *metabolism* care cuprinde asimilaţia, dezasimilaţia şi toate transformările de ordin chimic care se produc în materia vie propriu-zisă din protoplasmă.

Deducţiile de mai sus nu dau lămuriri cu privire la structura materiei vii. S-ar părea însă că precizările în această privinţă ar putea fi obţinute prin procedeul clasic folosit atît de larg în chimie pentru stabilirea structurii celor mai diferiţi compuşi organici şi minerali. Se ştie că chimistul caracterizează orice substanţă pură prin structura ei chimică, iar pentru a stabili această structură el cercetează multilateral însuşirile substanţei respective. Bazat pe principiul interdependenţei dintre structură şi însuşiri, chimistul deduce structura substanţei dacă cunoaşte în suficientă măsură însuşirile ei. Or, aplicarea acestui procedeu în vederea stabilirii structurii materiei vii întîmpină dificultăţi, datorită faptului că această materie nu poate fi izolată din organisme. Astfel, chimistul neavînd la dispoziţie materia vie separată de materia nevie, cu care coexistă

în protoplasmă, nu poate afla nemijlocit, prin procedee chimice curente, însușirile materiei vii în vederea stabilirii structurii ei. De aceea, trebuie căutate alte căi pentru rezolvarea acestei probleme, și una dintre ele constă în cercetarea desfășurării fenomenelor vieții. La prima vedere s-ar părea că fenomenele vieții nu pot da indicații cu privire la structura materiei vii, datorită complexității relațiilor dintre ele și structura respectivă. Totuși, ținînd seama de cele ce se cunosc în chimie, se poate afirma că structura materiei vii condiționează însușirile acestei materii, iar ținînd seama de datele biologiei, se poate afirma că însușirile materiei vii sînt acelea care condiționează manifestarea fenomenelor vieții. Astfel, din punct de vedere chimic, structura materiei vii se reflectă în însușirile ei, iar din punct de vedere biologic, însușirile materiei vii se reflectă în fenomenele vieții. Dacă această afirmație este justă, înseamnă că principiul unității dintre conținut și formă — aplicat cu atîta succes în chimie la nivelul relațiilor dintre structura chimică și însușirile materiei nevii — poate fi extins în biochimie la materia vie și aplicat la nivelul relațiilor dintre însușirile materiei vii și fenomenele vieții. Astfel, biochimistul, bazat pe cercetarea fenomenelor vieții, poate să ajungă la cunoașterea însușirilor materiei vii fără s-o izoleze, iar cunoscînd însușirile acestei materii, poate trece la caracterizarea structurii ei, ceea ce constituie primul pas spre stabilirea structurii materiei vii.

În urma explicațiilor de mai sus, se pot face unele precizări cu privire la materia vie, ținînd seama de faptul că diferitele ființe vii se deosebesc între ele prin modul de manifestare a fenomenelor vieții. Dacă admitem că aceste manifestări depind de însușirile, și deci de structura materiei vii cuprinse în organismele respective, ajungem la concluzia că însușirile și structura materiei vii diferă de la o ființă la alta. Prin urmare, ființele vii se deosebesc între ele prin calitatea materiei lor vii, noțiunea de calitate cuprinzînd aici atît particularitățile structurii materiei vii, cît și implicațiile acestor particularități asupra compoziției materiei nevii coexistente și asupra proceselor metabolice și biochimice care se produc în protoplasmă.

Alte precizări cu privire la însușirile și structura materiei vii se pot obține ținînd seama de viața, vitalitatea, conservatismul ereditar și variabilitatea pe care le manifestă toate viețuitoarele.

Fenomenul vieții, care constă într-o anumită mișcare și continuă transformare a materiei cuprinse în corpurile ființelor vii, arată că una din însușirile fundamentale ale materiei vii este reactivitatea ei permanentă, prin care această materie se deosebește fundamental și calitativ de orice materie nevie. Or, o materie aflată în stare de reactivitate permanentă, nu poate avea o structură fixă, comparabilă cu aceea a oricărui compus organic sau mineral. Reactivitatea permanentă a materiei vii este compatibilă numai cu o structură dinamică, aflată în continuă mișcare, ceea ce înseamnă că structura materiei vii prezintă specificul său propriu și nu poate fi asemuită cu nici una dintre structurile cunoscute pînă acum în chimia organică și minerală. De aceea, stabilirea acestei structuri va necesita cercetări speciale pe material viu, efectuate cu

ajutorul unor metode de investigație noi, ce se vor elabora anume în acest scop.

Vitalitatea, adică vigoarea de manifestare a vieții la ființele vii, poate fi concepută ca oglindirea la nivelul organismului a intensității reactivității materiei vii, și deci a dinamismului structurii acestei materii. Cu cît dinamismul structurii este mai accentuat, cu atît reactivitatea materiei vii și vitalitatea organismului respectiv sînt mai pregnante. Cum vitalitatea variază în funcție de împrejurări, nu numai de la o ființă la alta, ci și la una și aceeași ființă, înseamnă că reactivitatea materiei vii deși permanentă, nu este mereu aceeași : ca și dinamismul structurii materiei vii, ea poate varia în anumite limite, fără a se produce acele modificări esențiale ale structurii care s-ar repercuta asupra manifestării caracterelor ereditare.

Conservatismul ereditar al naturii organismelor arată că fiecare materie vie, deși aflată în continuă reactivitate, nu numai că își păstrează mereu calitatea și însușirile sale, dar opune o anumită rezistență față de factorii care tind s-o modifice. Aceasta înseamnă că orice materie vie, pe lîngă reactivitatea permanentă, prezintă și însușirea de stabilitate relativă. Prin urmare, structura materiei vii, cu tot dinamismul său, se găsește într-un anumit echilibru, singurul care în condițiile unei reactivități permanente poate asigura stabilitatea structurii și însușirilor acestei materii și, prin aceasta, stabilitatea manifestărilor vieții și naturii ființelor respective.

Variabilitatea organismelor arată că însușirile materiei vii depind și se modifică în funcție de condițiile mediului. Materia vie este deci plastică, iar plasticitatea ei se datorește structurii, care poate fi deformată mai mult sau mai puțin ușor. Astfel, deformabilitatea structurii dinamice a materiei vii este aceea care condiționează plasticitatea acestei materii.

Puterea de manifestare a tuturor însușirilor menționate ale materiei vii, nu este mereu aceeași. Fenomenul îmbătrînirii arată că în fiecare organism, pe măsură ce timpul trece, materia vie se modifică nereversibil și se apropie treptat de acea stare critică a existenței sale, cînd se dezagregă, transformîndu-se în materie nevie. Modificările progresive care se produc între timp în materia vie sînt caracterizate prin scăderea deformabilității structurii și micșorarea corespunzătoare a plasticității materiei vii, prin accentuarea echilibrului dinamic al structurii și creșterea corespunzătoare a stabilității relative a materiei vii, precum și prin slăbirea dinamismului structurii și scăderea corespunzătoare a reactivității aceleiași materii. Toate aceste modificări se repercutează asupra relațiilor dintre materia vie și cea nevie, coexistente în protoplasmă, și fac ca și relațiile dintre metabolism și biochimism să evolueze într-un anumit sens, ireversibil, în decursul vieții fiecărui organism.

Fenomenele biologice care se produc în cursul înmulțirii organismelor, de asemenea pot da informații cu privire la materia vie. Astfel, manifestarea caracterelor ereditare la descendenți indică anumite relații ce se creează între structurile celor două materii parentale din care se formează materia vie a descendenților.

Faptul că descendenții manifestă caracterele părinților, arată că materia vie a descendenților, formată în cursul fecundației din materiile vii parentale, acumulează și păstrează în ea particularitățile structurilor acestor materii. Rezultă că, cu tot dinamismul lor, structurile materiilor vii parentale cuprinse în materia vie a descendenților persistă în această materie timp îndelungat.

Persistența îndelungată a structurilor dinamice parentale în structura materiei vii din corpul descendenților, nu reprezintă în nici un caz rezultatul unei simple însumări pasive a structurilor respective. Se știe doar că două sisteme materiale dinamice, venind în contact, se influențează reciproc, în așa fel încît fiecare sistem tinde să-i imprime celuilalt felul său de mișcare. Deci, se poate admite că structurile dinamice ale materiilor vii maternă și paternă, unite prin fecundație, se influențează reciproc la nivelul contactelor dintre ele, în așa fel încît fiecare tinde s-o aducă pe cealaltă în concordanță cu specificul dinamismului său. Mersul acestei interacțiuni depinde însă de raporturile dintre natura celor două structuri conexe, de echilibrele lor dinamice, de deformabilitatea lor, precum și de condițiile mediului extern și intern în cadrul cărora se desfășoară interacțiunea. Structura care, în condițiile date ale mediului, are echilibrul dinamic mai accentuat, fiind mai stabilă, are mai multă șansă să-i imprime celeilalte particularitățile sale structurale, după cum structura cu deformabilitatea mai accentuată poate mai ușor să se pună în concordanță cu specificul acelei structuri a cărei deformabilitate, în condițiile date, este mai redusă. Acest proces de interacțiune și adaptare reciprocă a structurilor dinamice respective reprezintă unul din aspectele fundamentale ale transformărilor interne din materia vie a descendenților și duce adesea la dominarea parțială și chiar totală a unei structuri asupra celeilalte. Evoluția interacțiunii dintre structuri de proveniență și natură diferită, coexistente în materia vie a descendenților, se repercutează asupra însușirilor acestei materii, asupra fenomenelor metabolice și biochimice din organism și totodată asupra manifestării caracterelor lor ereditare.

Dar, nu numai atît. În cazurile cînd, datorită naturii însăși a fenomenelor de ordin chimic care se produc în materia vie a descendenților, apar în structura acesteia anumite configurații structurale noi, care nu au existat în structuriie celor două materii vii parentale, atunci la organismele respective apar noi manifestări ale vieții, noi caractere, care nu au existat la părinți și care se mențin atîta timp cît continuă să persiste în materia vie a descendentului noua configurație structurală. La fel, prin același mecanism, pot să dispară unele particularități ale structurii materiei vii, cu repercusiuni corespunzătoare asupra caracterelor ereditare. Rezultă că cercetarea modului de manifestare a caracterelor ereditare la descendenți, poate da indicații cu privire la evoluția interacțiunii dintre diferitele structuri coexistente în materia lor vie.

Dat fiind că dinamismul și deformabilitatea structurii materiei vii, precum și reactivitatea ei, depind de condițiile mediului, înseamnă că și relațiile dintre structurile parentale care coexistă în materia vie a descendenților, formînd baza materială a eredității lor, sînt și ele afectate de condițiile mediului în care trăiesc acești descendenți. Așa de exemplu,

poate fi de ajuns ca condițiile care favorizează adaptarea structurii paterne la cea maternă să se schimbe, pentru ca să devină posibil procesul invers, urmat de repercusiuni corespunzătoare asupra manifestării caracterelor ereditare. Astfel, de la dominarea inițială — parțială sau chiar totală — a structurii materne, se poate ajunge la un moment dat la inversarea situației, adică la dominarea structurii paterne. De aici posibilitatea apariției la descendenții îndepărtați a acelor caractere ereditare parentale care nu s-au manifestat la descendenții intermediari. Aceste modificări ale relațiilor dintre structurile parentale cuprinse în materia vie a descendenților, provocate de schimbarea condițiilor mediului, duc la modificarea însușirilor materiei vii și a raporturilor dintre această materie și materia nevie coexistentă și se repercutează asupra fenomenelor metabolice și biochimice din organism.

Cele expuse pot fi valabile nu numai pentru organismele întregi, ci și pentru fiecare parte constitutivă a unui organism dat. La nivelul diferitelor sale organe, țesuturi și celule, în funcție de împrejurări și condiții locale, interacțiunea dintre structurile coexistente în materia vie poate evolua în mod diferit, ducînd în unele părți ale corpului la precumpănirea uneia, iar în alte părți la precumpănirea alteia dintre structuri. Aceasta înseamnă că materia vie cuprinsă într-un organism poate prezenta diferențieri care să ducă la manifestări diferite ale caracterelor ereditare la nivelul diferitelor părți ale corpului unei și aceleiași ființe, inclusiv la nivelul celulelor ei sexuale.

Dacă vitalitatea descendenților oglindește reactivitatea materiei lor vii, și dacă la rîndul ei această reactivitate depinde de dinamismul structurii acestei materii, înseamnă că vitalitatea descendenților poate da indicații cu privire la dinamismul structurii materiei lor vii.

Vitalitatea în general scăzută a descendenților consangvinizați și a hibrizilor simpli între linii consangvinizate, indică o slabă reactivitate a materiei lor vii, precum și un dinamism restrîns al structurii acestei materii rezultată din materii parentale cu structuri apropiate. Vitalitatea în general sporită a hibrizilor obișnuiți, însoțită adesea de fenomenul de heterozis, arată că materia lor vie, formată din materii parentale cu structuri diferite, poate fi foarte reactivă, avînd o structură deosebit de dinamică. În fine, sterilitatea hibrizilor îndepărtați, atunci cînd ei se obțin, respectiv imposibilitatea obținerii hibrizilor prea îndepărtați, arată în primul caz un dinamism restrîns al structurii și slaba reactivitate a materiei vii respective, iar în al doilea caz imposibilitatea obținerii unei materii viabile, atunci cînd structurile parentale sînt excesiv de diferite. Prin urmare, reactivitatea materiei vii și deci dinamismul structurii ei pot varia în limite largi, intensitatea acestui dinamism fiind dependentă, între altele, și de gradul de deosebire dintre structurile parentale coexistente în materia vie a descendenților, adică de gradul de heterogenitate a materiei lor vii. S-ar părea că unei anumite heterogenități structurale optime îi corespunde un maxim de dinamism al structurii materiei vii, un maximum de reactivitate al acestei materii și cea mai intensă manifestare a vitalității, însoțită eventual de heterozis.

Se cunosc însă cazuri de manifestare a vitalității sportite la hibrizi proveniți din organisme parentale genetic apropiate, precum și cazuri cînd organisme parentale destul de deosebite dau hibrizi cu vitalitate scăzută. Asemenea cazuri arată că dinamismul structurii materiei vii, și prin urmare reactivitatea acestei materii, depind nu numai de heterogenitatea structurii ei, dar și de alți factori. Dintre aceștia, un rol însemnat îi revine naturii însăși a fiecăreia din structurile parentale coexistente în materia vie. Se știe doar că mici și în aparență neînsemnate modificări intervenite într-o structură se pot repercuta puternic asupra reactivității acesteia. De aceea, posibilitățile de interacțiune dintre structurile parentale pot fi atenuate sau sporite, în funcție de unele amănunte ale structurilor respective, chiar dacă aceste amănunte nu modifică esențial gradul de heterogenitate al materiei vii. Înseamnă că materia vie cu heterogenitate accentuată poate fi totuși de o reactivitate slabă, dacă contradicția dintre structurile ei parentale este mică, și invers, materia vie cu heterogenitatea internă redusă, poate fi totuși foarte reactivă, dacă contradicția dintre structurile parentale e suficient de accentuată. Dar nu numai atît. După cum s-a arătat mai sus, interacțiunea dintre structurile parentale cuprinse în materia vie mai depinde și de condițiile mediului, care pot contribui la intensificarea, respectiv slăbirea ei. Rezultă că vitalitatea cea mai accentuată a organismului se realizează atunci cînd reactivitatea materiei lui vii se desfășoară în condițiile heterogenității interne optime, a contradicției maxime și a mediului favorabil.

Faptul că fenomenul de heterozis, care se manifestă de obicei la primele generații hibride, dispare la generațiile următoare, poate fi interpretat în sensul că heterogenitatea, contradicția și dinamismul accentuat al structurii materiei vii la hibrizii cu heterozis duc la intensificarea interacțiunii dintre structurile parentale cuprinse în materia lor vie și la desfășurarea mai rapidă a proceselor de adaptare reciprocă a acestor structuri. De aici, micșorarea contradicției și scăderea progresivă a heterogenității și dinamismului structurii materiei vii și, prin urmare, scăderea reactivității acestei materii, scăderea vitalității organismelor și dispariția heterozisului. Păstrarea practic indefinită a vitalității organismelor în condițiile obișnuite ale înmulțirii, poate fi explicată și ea, dacă se admite că procesele care duc la diferențierea elementelor sexuale contribuie la asigurarea contradicției materiilor vii parentale din care se formează materia vie a descendenților.

Heterogenitatea structurii materiei vii poate fi realizată nu numai prin fecundație, ci și pe alte căi. Dacă sub acțiunea unor factori fizici, chimici sau biologici se ajunge la modificarea locală mai mult sau mai puțin persistentă a structurii materiei vii, și prin aceasta a compoziției și biochimismului materiei nevii coexistente, atunci porțiunea modificată a materiei vii poate să se comporte față de materia vie rămasă nemodificată ca o formațiune structurală nouă. Heterogenitatea structurii astfel realizată, se deosebește însă profund de cea care se realizează prin fecundație. În adevăr, în cazul fecundației se ajunge la coexistența a două structuri parentale, provenite din două materii vii mai mult sau mai puțin diferite, care înainte de fecundație au trecut printr-o diferențiere specifică formării

elementelor sexuale; aici însă avem de-a face cu două structuri, dintre care una este structura materiei vii care fie că a trecut, fie că nu a trecut prin diferenţierea prealabilă menţionată, şi alta, apărută din prima în urma acţiunii factorului respectiv. Cu toate acestea, este de aşteptat ca şi o astfel de heterogenitate a materiei vii să exercite asupra dinamismului structurii, reactivităţii materiei şi vitalităţii organismelor respective, repercusiuni asemănătoare celor condiţionate de heterogenitatea realizată prin fecundaţie.

Fenomenele de partenogeneză experimentală confirmă concluzia de mai sus. Se ştie doar că unii agenţi fizici şi chimici acţionînd asupra unor celule sexuale feminine pot provoca diviziunea partenogenetică a acestora. Or, din moment ce gametul feminin începe să se dividă, dînd dovada unei vitalităţi sporite, putem admite că agentul care a acţionat asupra gametului feminin a contribuit la sporirea heterogenităţii şi contradicţiei interne a structurii materiei lui vii şi, prin aceasta, la creşterea dinamismului structurii şi reactivităţii acestei materii. Tot aici pot fi încadrate şi fenomenele de sporire a vitalităţii ţesuturilor, organelor şi organismelor întregi sub acţiunea diferiţilor agenţi stimulatori.

Atît în partenogeneza experimentală, cît şi în stimulări, agenţii menţionaţi pot acţiona în moduri diferite. Se poate admite că în unele cazuri ei acţionează direct asupra materiei vii, provocînd anumite modificări în structura acesteia, ceea ce contribuie la creşterea heterogenităţii şi contradicţiei ei interne şi determină apariţia modificărilor corespunzătoare în biochimismul materiei nevii coexistente. În alte cazuri, acţiunea agenţilor asupra materiei vii poate fi indirectă, exercitîndu-se prin intermediul materiei nevii cu care materia vie coexistă: modificările locale ale biochimismului, apărute la nivelul materiei nevii sub acţiunea agenţilor respectivi pot antrena apariţia modificărilor corespunzătoare în structura materiei vii, accentuînd heterogenitatea şi contradicţia internă a acesteia. Vitalitatea sporită realizată fie într-un mod, fie în altul, durează de obicei un timp limitat şi nu se transmite la descendenţi. Aşa de exemplu, în cazuri de stimulări o dată cu încetarea acţiunii agentului stimulant, organismul poate reveni la starea iniţială. Aceasta arată că modificările structurii materiei vii provocate de agentul respectiv, se reduc la deformări mai mult sau mai puţin trecătoare. Sînt însă cazuri cînd efectele provocate de agenţi devin ereditare. Înseamnă că în astfel de cazuri s-a ajuns la modificări esenţiale şi persistente ale structurii materiei vii, care s-au încadrat în procesul ce duce la formarea elementelor sexuale.

Ideile de mai sus permit următoarea parafrazare a textului citat la începutul acestei lucrări: „Pentru modificarea naturii ereditătii organismelor vegetale, este necesar să se modifice structura materiei lor vii ... În cursul vieţii sînt posibile anumite deformări ale structurii materiei vii provocate de schimbarea condiţiilor mediului înconjurător ... În general, astfel de deformări nu parvin să tulbure nici echilibrul structurii dinamice a materiei vii, nici raporturile dintre materia vie şi cea nevie coexistente şi nici energetica proceselor metabolice şi biochimice condiţionate de această structură. Totuşi, în cursul vieţii se pot produce acele deformări,

de asemenea determinate de acțiuni externe, care ... prin modificarea structurii vechi duc la apariția unei structuri noi a materiei vii, avînd noi relații cu materia nevie coexistentă, — implicit la modificarea ereditară a diverselor particularități ale organismelor. Din punctul de vedere al biochimiei, ereditatea zdruncinată poate fi explicată tocmai ca acea deformare a structurii materiei vii care ... poate să permită stabilirea unei structuri dinamice noi. Privit de pe aceste poziții, caracterul conservator al eredității constă în gradul de stabilitate al echilibrului, care condiționează stabilitatea relativă a structurii dinamice a materiei vii, structură la care s-a ajuns în procesul evoluției îndelungate a organismelor".

Rezultă că diferitele ființe se deosebesc între ele prin particularitățile structurii materiei lor vii și că transformarea unei ființe în alta, cu alte însușiri, implică în primul rînd modificarea structurii acestei materii. Or, modificarea structurii dinamice a materiei vii duce la modificarea metabolismului ei, precum și la modificări corespunzătoare la nivelul materiei nevii coexistente și biochimismului organismului respectiv. Înseamnă că ipoteza despre materia vie și corelațiile ei cu materia nevie coexistentă nu numai că nu este în contradicție cu părerile actuale despre rolul metabolismului în ereditate ci, din contră, le completează, dezvoltă și întărește, oferindu-le o fundamentare mai firească și mai concretă. Este evident că efectuarea cercetărilor în domeniul hibridării plantelor de pe aceste poziții noi, implică alte obiective în căutarea mecanismului biochimic al eredității în general și al hibridării în special, decît în cazul cercetărilor bazate pe părerile actuale despre compoziția chimică a viețuitoarelor. Deosebirile respective vor fi scoase și mai bine în evidență în lucrările viitoare în care va fi analizată problema hibridării vegetative a plantelor și vor fi adîncite diferitele aspecte ale structurii și naturii materiei vii, pe baza fenomenelor din domeniul diferențierii, diviziunii și proliferării celulare.

Considerațiile expuse aici despre materia din care sînt alcătuite ființele vii reprezintă prima încercare de dezvoltare a unor idei publicate sumar acum cîțiva ani. Ele izvorăsc din dorința de a căuta căi noi pentru aprofundarea cercetărilor biochimice în biologie și formează baza unei ipoteze de lucru încă în curs de elaborare care, de pe acum, permite interpretarea nouă a unora dintre fenomenele care se produc în organismele vii și oferă noi puncte de plecare pentru cercetări experimentale. De aceea, am considerat utilă publicarea acestei ipoteze de lucru, convins fiind că criticile și obiecțiile ce i se vor aduce, vor contribui la perfecționarea și dezvoltarea ei.

Prezentată la redacție la
20 iunie 1963

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.
și
Catedra de biochimie a Universității din București

ЖИВАЯ МАТЕРИЯ И ЕЕ РОЛЬ В ГИБРИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

РЕЗЮМЕ

Основываясь на некоторых выводах, опубликованных в одной из своих предыдущих работ, автор формулирует рабочую гипотезу по вопросу живой материи, из которой состоят живые существа. Согласно этой гипотезе, живая протоплазма состоит из двух совершенно различных видов материи: из живой материи и неживой материи, взаимно проникающих друг в друга и находящихся в отношениях функционального сосуществования. Неживая материя состоит из различных обычных химических производных, с общеизвестной химической структурой. Живая материя состоит из таких же материальных частиц, как и неживая материя, но обладает структурой, которая радикально и качественно отличается от структуры неживой материи. Ассимиляция, т.е. превращение обычных химических веществ в живую материю, представляет собою процесс включения этих веществ в совершенно особую структуру, имеющую высшую степень организации по сравнению со структурой и организацией неживой материи. В результате включения в эту особую структуру ассимилированные вещества перестают быть тем, чем они были, и в совершенно новой форме участвуют в проявлениях свойств живой материи, в структуру которой они были включены. Диссимиляция состоит в превращении живой материи в неживую материю, т.е. в различные общеизвестные химические производные.

Живая материя существует только в живой протоплазме. Вместе со смертью протоплазмы живая материя перестает существовать и подвергается распаду, превращаясь в различные обычные химические вещества. Существование живой материи обусловливается взаимодействием и взаимной функциональной зависимостью от сосуществующей неживой материи; следовательно, живая материя не может быть отделена от неживой материи, так как в момент отделения это взаимодействие прекращается и живая материя подвергается распаду.

Химические превращения, которые происходят в неживой материи протоплазмы, представляют собою биохимические реакции, которые могут быть воспроизведенны *in vitro*. Превращения химического порядка, которые происходят в живой материи, представляют собою обменные реакции, коренным образом отличающиеся от обычных химических реакций, так как они осуществляются в условиях совершенно особой структуры. Следовательно, биохимизм охватывает все химические процессы, происходящие в неживой материи, а обменные процессы включают: процессы ассимиляции, диссимиляции и все превращения химического порядка, происходящие в живой материи протоплазмы.

В связи с особенностями живой материи и ее структурой можно сделать различные уточнения, если допустить, что структура этой материи отражается в ее свойствах и что свойства живой материи отражаются в жизненных явлениях. Таким образом, исследуя жизненные

явления, можно изучить и установить свойства живой материи и тем самым установить характеристику ее структуры.

Основываясь на этом принципе, было сделано заключение, что живые существа отличаются друг от друга качеством своей живой материи, т.е. теми особенностями структуры и признаков этой материи, которые обусловливают различия в проявлениях метаболических и биохимических процессов, а также и жизненных явлений.

Был также сделан вывод, что структура живой материи, будучи динамической структурой, находящейся в непрерывном движении, отличается своими специфическими особенностями и не может быть сравнена ни с одной из структур, известных до настоящего времени в области органической и минеральной химии. Динамика структуры живой материи характеризуется определенным равновесием; структура же обладает возможностями деформации, без возникновения тех существенных изменений, которые могут отражаться на проявлениях наследственных признаков.

Вследствие этих особенностей своей структуры живая материя обладает свойством непрерывной реактивности, относительной устойчивости и пластичности, чем она глубоко отличается от любого обычного химического продукта. Динамика структуры живой материи обусловливает реактивность этой материи и отражается в жизненности организмов. Равновесие структуры живой материи обусловливает ее сравнительную устойчивость и отражается в консерватизме природы организмов. Способность структуры живой материи к деформации обусловливает ее пластичность и отражается в изменчивости организмов. Поведение структуры и свойства живой материи не остаются постоянно одинаковыми; они варьируют в зависимости от условий среды и возраста организмов.

Проявление наследственных признаков в последующих поколениях указывает, что, несмотря на всю свою динамику, структуры обеих родительских материй, из которых образуется живая материя потомков, сохраняются в их живой материи продолжительное время, взаимно влияя друг на друга таким образом, что каждая из них стремится привести другую материю в условия, соответствующие специфичности ее динамики. Этот процесс взаимодействия и взаимной адаптации обеих родительских структур представляет собой один из основных аспектов внутренних превращений, происходящих в живой материи последующих поколений и зачастую влечет за собою частичное, а иногда даже и полное преобладание одной структуры над другой. Динамика этого взаимодействия отражается как на обменных и биохимических явлениях, так и на картине проявления наследственных признаков у последующих поколений. Явления химического порядка, которые происходят в живой материи потомков могут вызвать появление новых структуральных конфигураций, которые не существовали в родительских структурах и, таким образом, у потомков появляются новые признаки, новые особенности, которые не существовали у родителей. Путем этого же механизма могут исчезать некоторые особенности структуры живой ма-

терии с соответствующими последствиями относительно проявления наследственных признаков.

Отношения между родительскими структурами, сосуществующими в живой материи потомков, зависят от условий наружной и внутренней среды. Если в определенных условиях эти отношения ведут к преобладанию одной из этих структур с соответствующими проявлениями наследственных признаков у потомков, то изменение условий среды может вызвать в определенный момент преобладание другой структуры, в результате чего у отдаленных потомков могут появиться наследственные признаки, которые не проявлялись у промежуточных поколений.

Степень реактивности живой материи и интенсивность динамики ее структуры зависят как от различий между родительскими структурами, сосуществующими в живой материи потомков, т.е. от гетерогенности структуры этой материи, так и от противоречий между природой соответствующих родительских структур. Условия среды могут содействовать усилению или ослаблению этой реактивности. Поэтому максимальная жизненность организма, сопровождающаяся иногда гетерозисом, проявляется тогда, когда реактивность живой материи развертывается в оптимальных условиях гетерогенности, и противоположностей а также в условиях благоприятной среды.

Гетерогенность структуры живой материи может осуществляться не только путем оплодотворения, но также и в результате действия различных физических, химических и биологических факторов на живую материю. Осуществленная этим путем гетерогенность, несмотря на то, что глубоко отличается от гетерогенности полученной путем оплодотворения, может также обусловить усиление динамики структуры живой материи и жизненности соответствующих организмов.

Все эти соображения относительно материи, содержащейся в живых существах, представляют собою только первую попытку разработки идей, опубликованных автором настоящей статьи уже несколько лет тому назад. Они исходят из желания найти новые пути для углубления биохимических исследований в области биологии и представляют собою основу разрабатываемой в настоящее время рабочей гипотезы, которая позволяет интерпретировать с новой точки зрения некоторые явления, происходящие в живых организмах, и ведет к новым экспериментальным исследованиям.

LA MATIÈRE VIVANTE ET SON RÔLE DANS L'HYBRIDATION DES PLANTES

RÉSUMÉ

En partant de certaines considérations publiées dans un précedent travail, l'auteur formule une hypothèse concernant la matière constitutive des êtres vivants. Selon cette hypothèse, le protoplasma vivant est

constitué par deux sortes de matière profondément différentes : la matière vivante et la matière non vivante, qui s'interpénètrent et se trouvent en relations de coexistence fonctionnelle. La matière non vivante est constituée par divers composés chimiques ordinaires, à structure chimique connue. La matière vivante est constituée par des particules matérielles de même nature, mais comportant une structure qui diffère fondamentalement et qualitativement de celle de la matière non vivante. L'assimilation, c'est-à-dire la transformation des substances chimiques ordinaires en matière vivante, consiste dans une intégration de ces substances dans une structure tout à fait spéciale, située à un degré d'organisation supérieur à la structure et à l'organisation de la matière non vivante. Par l'intégration dans cette structure spéciale, les substances assimilées cessent d'être ce qu'elles étaient et participent d'une manière nouvelle à la manifestation des propriétés de la matière vivante à la structure de laquelle elles se sont conformées. Par contre, la désassimilation consiste dans la transformation de la matière vivante en matière non vivante, c'est-à-dire dans divers composés chimiques connus.

La matière vivante ne peut exister que dans le protoplasma vivant. Dès que le protoplasma meurt, la matière vivante cesse d'exister comme telle et se désagrège, se transformant en différents composés chimiques ordinaires. Comme l'existence de la matière vivante est due à l'interaction et à l'interdépendance fonctionnelle avec la matière non vivante coexistante, il s'ensuit que la matière vivante ne peut pas être séparée de la matière non vivante, puisqu'au moment de la séparation, l'interaction étant supprimée, la matière vivante se désagrège.

Les transformations chimiques survenant dans la matière non vivante du protoplasma représentent des réactions biochimiques qu'on peut reproduire *in vitro* ; les transformations chimiques qui se produisent dans la matière vivante représentent des réactions métaboliques, qui diffèrent fondamentalement des réactions chimiques ordinaires, puisqu'elles surviennent dans les conditions d'une structure très particulière. Aussi, le biochimisme embrasse-t-il tous les processus chimiques se produisant dans la matière non vivante, tandis que le métabolisme comprend l'assimilation, la désassimilation et toute transformation d'ordre chimique se produisant dans la matière vivante du protoplasma.

On peut obtenir des précisions sur la structure et sur les propriétés de la matière vivante, si l'on admet que la structure de cette matière se reflète dans ses propriétés et que celles-ci sont reflétées par les phénomènes de la vie. Par l'étude des phénomènes de la vie on peut donc arriver à connaître les propriétés de la matière vivante, et de là, à caractériser sa structure.

En vertu de ce principe, il s'ensuit que les êtres vivants diffèrent entre eux par la qualité de leur matière vivante, c'est-à-dire par ces mêmes particularités de la structure et des propriétés de cette matière, qui déterminent les différences dans la manifestation des processus métaboliques et biochimiques ainsi que des phénomènes de la vie.

On déduit de même que la structure de la matière vivante, étant une structure dynamique, en perpétuel mouvement, doit posséder un

caractère bien spécifique et par là même, ne peut être comparée à aucune des structures connues jusqu'ici dans la chimie organique et minérale. Le dynamisme de la structure de la matière vivante est caractérisé par un certain équilibre et la structure présente des possibilités de déformation, sans nécessairement entraîner des modifications structurales essentielles, qui pourraient avoir des répercussions sur la manifestation des caractères héréditaires. A cause de ces particularités de structure, la matière vivante manifeste les propriétés de réactivité permanente, de stabilité relative et de plasticité, qui la distinguent profondément de n'importe quel autre produit chimique usuel. Le dynamisme de la structure de la matière vivante détermine la réactivité de cette matière et se reflète dans la vitalité des organismes. L'équilibre de la structure de la matière vivante conditionne la stabilité relative de cette matière et se reflète dans le conservatisme de la nature des organismes. La déformabilité de la structure de la matière vivante détermine la plasticité de cette matière et se reflète dans la variabilité des organismes. Le comportement de la structure et la manifestation des propriétés de la matière vivante ne restent pas toujours les mêmes, mais varient continuellement en raison des conditions ambiantes et de l'âge des organismes.

La manifestation des caractères héréditaires chez les descendants démontre que malgré leur dynamisme, les structures des deux matières parentales (à partir desquelles se forme la matière vivante des descendants) persistent longtemps dans la matière vivante de ceux-ci, s'influençant mutuellement de telle sorte que chacune tend à rendre l'autre en concordance avec le spécifique de son dynamisme. Ce processus d'interaction et d'adaptation réciproque des deux structures parentales représente l'un des aspects fondamentaux des transformations internes de la matière vivante des descendants et aboutit souvent à une domination partielle ou même totale de l'une d'elles sur l'autre. L'évolution de cette interaction se répercute tant sur les phénomènes métaboliques et biochimiques que sur la manière de se manifester des caractères héréditaires chez les descendants. Les phénomènes d'ordre chimique ayant lieu dans la matière vivante des descendants peuvent entraîner l'apparition de nouvelles configurations structurales, qui n'existaient pas dans les structures parentales ; c'est ainsi que peuvent apparaître de nouveaux caractères, de nouvelles manifestations de la vie chez les descendants. Par le même mécanisme, certaines particularités de la structure de la matière vivante peuvent disparaître, entraînant des conséquences correspondantes dans la manifestation des caractères héréditaires.

Les relations entre les structures parentales coexistant dans la matière vivante des descendants dépendent des conditions du milieu externe et interne. Si, dans certaines circonstances, ces relations évoluent vers la domination de l'une des structures — avec des conséquences correspondantes dans la manière de se manifester des caractères héréditaires chez les descendants respectifs — un changement dans les conditions ambiantes peut inverser le cours de cette évolution, en conduisant à un certain moment à la prédominance de l'autre structure. De là, apparition chez les

descendants lointains de caractères héréditaires qui ne s'étaient pas manifestés chez les descendants intermédiaires.

Le degré de réactivité de la matière vivante et l'intensité du dynamisme de sa structure dépendent tant des différences entre les structures parentales coexistant dans la matière vivante des descendants, c'est-à-dire de l'hétérogénéité de la structure de cette matière, que de la contradiction entre les natures des respectives structures parentales. Les conditions du milieu peuvent elles aussi contribuer à intensifier ou à affaiblir cette réactivité. C'est pourquoi la vitalité maximum de l'organisme, accompagnée éventuellement d'hétérosis, se manifeste lorsque la réactivité de la matière vivante se développe dans les conditions de l'hétérogénéité interne optimum, de la contradiction maximum et du milieu favorable.

L'hétérogénéité de la structure de la matière vivante peut être obtenue non seulement par la fécondation, mais aussi par l'action des divers facteurs physiques, chimiques et biologiques sur la matière vivante. L'hétérogénéité réalisée par les derniers moyens, quoique profondément différente de celle obtenue par la fécondation, peut quand même déterminer elle aussi l'accroissement du dynamisme de la matière vivante et de la vitalité des organismes respectifs.

Les précédentes considérations sur la matière contenue dans les êtres vivants représentent une première tentative de développement de certaines idées publiées par l'auteur il y a quelques années. Elles constituent l'assise d'une hypothèse de travail encore en cours d'élaboration, mais qui dès maintenant permet une interprétation nouvelle de certains phénomènes se produisant dans les organismes vivants et qui offre de nouveaux points de départ pour les recherches expérimentales.

BIBLIOGRAFIE

1. А. Фрей-Висслинг, Субмикроскопическое строение протоплазмы и ее производных. Издательство иностранной литературы, Москва, 1950, стр. 162.
2. Большая Советская Энциклопедия. Живая материя. Государственное научное издательство Б С Э. Второе издание, 1952, Том 16, стр. 88.
3. A. I. Oparin, *Originea vieţii pe pămînt*, Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1960. *a*) pag. 336; *b*) pag. 322.
4. Н. М. Сисакян, Биохимия обмена веществ, Издательство АН СССР, Москва, 1954, стр. 194—195.
5. E. Macovschi, *Materia vie şi geneza ei*, Contemporanul, Bucureşti, 1958, nr. 34, pag. 1.
6. E. Macovschi, *Materia vie şi geneza ei*, în *Culegere de studii* : *„Materialismul dialectic şi ştiinţele contemporane ale naturii"*, Edit. politică, Bucureşti, 1959, pag. 155.
7. E. Macovschi, *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie, IV, *1*, 11 (1959).

METODA DESPICĂRII PENTRU CERCETĂRI BIOCHIMICE COMPARATIVE LA PLANTE

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI şi LILICA BOTOŞĂNEANU

Cercetările în domeniul biochimiei plantelor întîmpină anumite dificultăţi atunci cînd indicii biochimici variază mult de la o plantă la alta. În asemenea cazuri se impune executarea cercetărilor pe un număr mare de plante şi folosirea calculului statistic pentru interpretarea rezultatelor experimentale.

Acest inconvenient s-ar înlătura dacă aceeaşi plantă, secţionată longitudinal în două, ar servi o jumătate pentru experimentare, iar cealaltă jumătate ca martor, dat fiind că părţile simetrice ale plantei prezintă de obicei o compoziţie şi o comportare biochimică asemănătoare. În aceste condiţii, orice modificare biochimică provocată la partea tratată a plantei s-ar putea pune imediat în evidenţă, iar experimentarea numai pe cîteva plante ar putea duce la rezultate concludente, evitîndu-se cercetări laborioase. Procedeul acesta s-ar apropia de cel folosit curent în cercetarea biochimismului muscular, cînd la acelaşi animal unul dintre muşchii simetrici este supus experimentării, pe cînd celălalt serveşte drept martor.

În vederea elaborării metodei respective, trebuia în prealabil stabilit dacă plantele cu tulpini despicate pînă la rădăcină şi reunite după intercalarea între cele două jumătăţi a unei fîşii subţiri de material impermeabil (de ex. gutiplast, foiţă de cauciuc etc.), pot supravieţui. De aceea, am efectuat cîteva experienţe preliminare pe plante de tomate, vinete, balsamine şi muşcate, la care reunirea tulpinilor despicate şi separate prin gutiplast s-a asigurat cu legături de leucoplast, la distanţe de 5—7 cm una de alta, precum şi prin înfăşurarea helicoidală a tulpinii cu rafie. S-a constatat că plantele astfel prelucrate continuă să trăiască timp îndelungat, săptămîni de-a rîndul, dacă legăturile asigură etanşeitatea reunirii celor două jumătăţi.

Din moment ce plantele supravieţuiesc, urma să precizăm dacă părţile simetrice ale plantelor despicate prezintă aceleaşi valori ale indicilor biochimici şi dacă substanţele ce se introduc într-una din jumătăţile tulpinii se răspîndesc şi acţionează numai în partea respectivă a plantei.

În consecinţă, am efectuat întîi o serie de analize pe plante de tomate, soiul Zeelandia, în vîrstă de 3—4 luni, şi soiul Aurora, în vîrstă de 2—3 luni, determinînd după 48 de ore de la despicare azotul total (la soiul Zeelandia) şi activitatea peroxidazică (la soiul Aurora), atît în frunzele ce provin de la două etaje diferite, cît şi în jumătăţile simetrice alte tulpinilor; la tulpini (soiul Zeelandia) am mai măsurat şi consumul de oxigen. Pentru dozarea azotului total, materialul vegetal se usca la 105°C pînă la greutate constantă, iar kjeldahlizarea se făcea în condiţiile preconizate de A. N. Belozerski şi N. I. Proscuriakov [1]; pentru stabilirea activităţii peroxidazice am recurs la micrometoda D. M. Mihlin şi Z. S. Bronoviţkaia, descrisă în tratatul lui A. I. Ermakov şi colab. [2]; consumul de oxigen se măsura cu aparatul Warburg, în condiţiile descrise într-o lucrare anterioară [3].

După cum rezultă din unele date experimentale, trecute în tabela 1, părţile simetrice ale plantelor despicate prezintă valori asemănătoare pentru cei trei indici biochimici menţionaţi. Înseamnă că despicarea tulpinii nu modifică raporturile dintre valorile indicilor biochimici din cele două părţi simetrice ale plantei.

Tabela 1

Azotul total şi consumul de oxigen la tomate despicate, soiul Zeelandia, vîrsta 3—4 luni, şi activitatea peroxidazică la tomate soiul Aurora, vîrsta de 2—3 luni (cele două jumătăţi ale plantei despicate sînt notate cu I şi II)

Indicele biochimic	Planta nr.	Frunze				Tulpini	
		Etajul de sus		Etajul de jos			
		I	II	I	II	I	II
Azotul total (mg/g material uscat)	1	32,2	29,4	29,4	26,9	13,2	12,9
	2	30,0	27,7	26,9	25,5	11,8	10,9
Activitatea peroxidazică (ml iod 0,01 N/g material proaspăt)	3	1,5	1,7	2,6	2,8	5,6	5,4
	4	4,7	4,5	5,3	4,5	5,9	5,8
Consumul de oxigen (ml O_2/g material proaspăt)	5	—	—	—	—	148	169
	6	—	—	—	—	94	93

Cu această ocazie, am mai efectuat, în aceleaşi condiţii, cîteva determinări comparative ale activităţii peroxidazice (la soiul Aurora) la părţile simetrice atît ale plantelor despicate cît şi ale celor nedespicate. Rezultatele, cuprinse în tabela 2, arată că la plantele analizate valorile acestui indice sînt de acelaşi ordin de mărime, ceea ce înseamnă că, cel puţin în cazul peroxidazei, despicarea plantei nu modifică activitatea acestei enzime.

Apoi, am examinat dacă diferitele substanţe pătrunse într-una din jumătăţile plantei despicate se răspîndesc şi acţionează numai în jumătatea respectivă. În acest scop, am introdus, prin metoda capilară (4), (5), într-una din jumătăţile tulpinilor de tomate din soiul Zeelandia, în vîrstă de 3—4 luni şi de aproximativ 40—50 cm înălţime, soluţie 1% de pironină, care se răspîndeşte în plantă colorînd-o în roşu, soluţie 10%

Tabela 2

Activitatea peroxidazică (exprimată în ml iod 0,01 N/g material proaspăt) la tomate despicate și nedespicate, soiul Aurora, vîrsta 2—3 luni (cele două jumătăți ale plantei despicate sînt notate cu I și II; la plantele nedespicate frunzele s-au recoltat din partea stîngă și dreaptă a aceleiași plante)

Experiența	Planta nr.	Frunze				Tulpini	
		Etajul de sus		Etajul de jos			
		I	II	I	II	I	II
Plante despicate	3	1,5	1,7	2,6	2,8	5,6	5,4
	4	4,7	4,5	5,3	4,5	5,9	5,8
		Stînga	Dreapta	Stînga	Dreapta		
Plante nedespicate	7	2,0	2,1	2,2	2,1	3,2	
	8	4,3	4,8	5,4	4,6	5,5	

de azotat de amoniu, destul de concentrată pentru ca să producă atît intoxicarea plantei cît și creșterea azotului total, precum și soluție diluată de *2, 4*-dinitrofenol 2.10^{-3} M, care reduce intensitatea consumului de oxigen. Pentru introducerea soluțiilor în plante am folosit tuburi de sticlă în U, de 0,7 cm diametru și cu o capacitate de aproximativ 3,0 ml, și fitil alcătuit din 6 fire de bumbac Nm 50/3. Tratamentul a durat 24—48 de ore, timp în care pătrundeau în plante 2—4 ml soluție.

S-a constatat că pironina se răspîndește numai în jumătatea plantei în care a fost introdusă, colorînd-o intens în roșu.

În cazul soluției de azotat de amoniu, chiar a doua zi după începerea tratamentului frunzele părții tratate începeau să prezinte fenomene de epinastie și tendință de vestejire, care se accentuau, astfel încît, în a treia zi, jumătatea tratată a plantei era intoxicată complet, pe cînd cealaltă jumătate se comporta cu totul normal (fig. 1).

Fig. 1. — Rezultatul unei experiențe efectuate pe o tomată despicată. Partea dreaptă — martor; partea stîngă — după tratament timp de două zile cu soluție de azotat de amoniu 10% (4,0 ml) introdusă prin metoda capilară.

Determinările de azot total la plantele intoxicate cu azotat de amoniu au arătat că, atît frunzele, cît și jumătățile de tulpini din partea tratată a plantei, cuprindeau o cantitate mai mare de azot decît părțile simetrice din jumătatea netratată (tabela 3).

Consumul de oxigen la jumătățile de tulpini tratate cu *2, 4*-dinitrofenol, timp de 24 de ore, s-a redus considerabil în comparație cu acela al jumătăților simetrice ale tulpinii care nu au fost tratate cu acest inhibitor (tabela 3).

Tabela 3

Azotul total la tomate despicate, soiul Zeelandia, vîrsta 3—4 luni, una din jumătățile tulpinii fiind tratată cu azotat de amoniu 10%. Consumul de oxigen la tulpini de tomate soiul Zeelandia, vîrsta 3—4 luni, una din jumătățile tulpinii fiind intoxicată cu 2,4- dinitrofenol 2.10^{-3} M

Indicele biochimic	Planta nr.	Frunze				Tulpini	
		Etajul de sus		Etajul de jos			
		Netratat	Tratat	Netratat	Tratat	Netratat	Tratat
Azotul total (mg/g material uscat)	9	31,1	45,9	25,5	42,0	14,8	18,5
	10	33,6	66,6	30,0	44,5	22,7	33,0
Consumul de oxigen (ml O_2/g material proaspăt)	11	—	—	—	—	196	8
	12	—	—	—	—	144	8

Rezultă că pironina, azotatul de amoniu și *2, 4*-dinitrofenolul pătrund cu ușurință și se răspîndesc în decurs de două zile numai în acele jumătăți ale plantelor în care au fost introduse. Nu este însă exclus ca, după un timp mai îndelungat, anumite substanțe, introduse într-una din jumătățile tulpinii, să ajungă, prin rădăcini, în cealaltă jumătate. Aceasta înseamnă că aplicabilitatea metodei despicării depinde atît de natura plantelor și substanțelor, cît și de durata tratamentului*).

Materialul experimental prezentat în această lucrare demonstrează că metoda despicării poate fi folosită pentru cercetări comparative în domeniul biochimismului vegetal, prezentînd avantajul că poate da rezultate concludente chiar și atunci cînd se experimentează pe un număr restrîns de plante.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

Prezentată la redacție la 7 iulie 1963

МЕТОД РАСЩЕПЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ ПРИ СРАВНИТЕЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

РЕЗЮМЕ

Исследования в области биохимии растений требуют осуществления опытов на большом числе растений если биохимические показатели

*) Cercetările sînt în curs pentru stabilirea condițiilor de utilizare în același scop a plantelor total despicate.

у исследуемых экземпляров варьируют в широких пределах. Авторы в своей статье указывают, что этот недостаток может быть легко устранен, если одно и то же растение расщепить вдоль на две половины, снова соединить обе половины после введения между ними тонкой полоски из непроницаемого материала, а затем одну из этих половин использовать для эксперимента, а другую — для контроля. Обработанные этим путем растения продолжают жить долгое время; биохимические показатели симметрических половин дают почти одинаковые значения, а растворы различных веществ, введенные в одну из половин при помощи капиллярного метода, распространяются и действуют только в соответствующей половине растения. Таким образом, любое биохимическое изменение, вызванное в половине растения, подвергшейся обработке, может быть легко выявлено, и этот метод представляет то преимущество, что он дает убедительные результаты, даже тогда, когда опыты производятся на ограниченном числе растений.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Результат опыта на расщепленном стволе помидора. Правая половина — контрольная; левая половина — после введения в течение 2 дней 10 %-го раствора азотата аммония (4,0 мл) с использованием капиллярного метода.

MÉTHODE DU FENDAGE POUR LES RECHERCHES BIOCHIMIQUES COMPARATIVES SUR DES PLANTES

RÉSUMÉ

Les recherches dans le domaine de la biochimie végétale nécessitent l'expérimentation sur un grand nombre de plantes lorsque les indices biochimiques varient considérablement d'une plante à une autre. Les auteurs ont démontré qu'on peut éliminer cet inconvénient si l'on sectionne la plante dans le sens de la longueur et si l'on réunit les deux parties après avoir intercalé une mince bande de matériel imperméable ; on peut utiliser ensuite une moitié pour l'expérience, tandis que l'autre sert de témoin. Les plantes traitées de la sorte continuent longtemps à vivre ; les indices biochimiques des parties symétriques présentent des valeurs rapprochées et les solutions de diverses substances introduites dans l'une des moitiés par la méthode capillaire se répandent et agissent seulement dans la moitié respective. De cette manière, toute modification biochimique provoquée dans la partie traitée de la plante peut être aisément mise en évidence. La méthode possède aussi l'avantage de donner des résultats concluants même lorsqu'on expérimente sur un nombre restreint de plantes.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Résultat d'une expérience effectuée sur une plante de tomate fendue. La partie à droite — témoin ; la partie à gauche — après traitement pendant deux jours avec une solution d'azotate d'ammonium à 10% (4,0 ml) introduite par la méthode capillaire.

BIBLIOGRAFIE

1. А. Н. Белозерский, Н. И. Проскуряков, *Практическое руководство по биохимии растений*, Издательство „Советская наука", Москва, 1951, стр. 106.
2. А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, М. И. Смирнова, И. Конникова и И. К. Мурри, *Методы биохимического исследования растений*. Издательство сельскохозяйственной литературы, Москва—Ленинград, 1952, стр. 65.
3. E. Macovschi, V. Frunzeti, L. Botoşăneanu, *Factorii fizico-chimici şi metabolici în transportul diferitelor soluţii în plante*, St. cercet. biochimie, **IV**, *4*, 433 (1961).
4. E. Macovschi, *Metoda capilară pentru introducerea compuşilor chimici şi produşilor biologici în corpul plantelor*, Com. Acad. R.P.R., **VIII**, 183, 1958 ; Preslia, **XXX**, 252 (1958).
5. Е. Маковский, *Капиллярный метод и перспективы его применения*. Сельское хозяйство за рубежом, Растениеводство, *6*, 31 (1963).

CERCETĂRI ASUPRA UNOR CARACTERE BIOCHIMICE SPECIALE ALE PORUMBULUI

III. MANIFESTAREA HETEROZISULUI ACIZILOR NUCLEICI LA HIBRIZII SIMPLI ÎNTRE LINII CONSANGVINIZATE DE PORUMB

DE

C. BODEA, D. OȘIANU[1]) și I. CĂBULEA[2])

Heterozisul, ca fenomen biologic, constă în superioritatea organismelor hibride, îndeosebi în generația întîi (F_1), față de formele parentale. Fenomenul de heterozis afectează în mod complex toate caracterele organismelor hibride, manifestîndu-se : din punct de vedere somatic, prin sporirea greutății și volumului diferitelor organe ale plantei, precum și prin intensitatea creșterii ; din punct de vedere reproductiv, prin sporirea numărului și greutății semințelor, iar din punct de vedere adaptativ, prin mărirea rezistenței față de factorii nefavorabili de mediu, boli sau dăunători.

Utilizarea practică a fenomenului de heterozis a primit o largă răspîndire la multe plante, și îndeosebi la cultura porumbului. La această plantă, prin numeroasele cercetări efectuate în ultimele cinci decenii, s-au obținut realizări deosebite, care s-au concretizat prin utilizarea pe scară mondială a semințelor dublu hibride, obținute în urma încrucișării formelor parentale, constînd din linii consangvinizate [1—4].

Numeroase cercetări au fost efectuate pentru aprofundarea formelor de manifestare a heterozisului și explicarea cauzelor care ar determina declanșarea acestui fenomen. Mai recent preocupările s-au îndreptat spre studiul proceselor fiziologice care se petrec la organismele hibride de porumb, în comparație cu liniile consangvinizate parentale [5—8].

Relativ puține cercetări se referă la manifestările biochimice ale heterozisului [5] [9—12], și îndeosebi la substanțele care ar controla intensificarea proceselor metabolice la hibrizi.

---

[1]) Pentru partea biochimică.
[2]) Pentru partea biologică.

N. V. Turbin (13), în expunerea asupra „Teoriei echilibrului genetic" cu privire la heterozis, menţionează că, în căutarea cauzelor acestui fenomen vor trebui aprofundate problemele legate de reglarea proceselor de dezvoltare ale organismelor hibride. În cadrul acestei teorii, dezvoltarea fiecărui caracter este controlată de acţiunea reciproc echilibrată a factorilor stimulatori sau inhibitori ai intensităţii de manifestare a caracterului.

A. Bálint şi colaboratori [11] [12] aplică pentru studierea bazelor teoretice ale fenomenului heterozis, metode combinate de genetică, fiziologie şi biochimie şi ajung la concluzia că acest fenomen nu poate fi redus la o cauză unică. Studiind fracţiunile fosforice şi azotate ale liniilor, soiurilor şi hibrizilor de porumb, au constatat că, în cazul hibrizilor, se observă în general o asimilare mai ridicată a cantităţilor de azot şi fosfor. Din analizele efectuate asupra fracţiunilor fosforice din seminţe şi organele sexuale, constată că, în general, există un avantaj al hibrizilor faţă de linii, în ce priveşte conţinutul total de acizi nucleici. Totodată, se face presupunerea că în urma polenizării cu polenul părintelui, procesele metabolice la plantele materne decurg mai intens decît în cazul autopolenizării.

Cercetările anterioare sesizează o manifestare generală a heterozisului încă din primele faze ale creşterii plantulelor hibride. Aceasta ne determină să considerăm însăşi compoziţia biochimică a boabelor hibride ca o bază a proceselor metabolice intensificate la hibrizi.

Cercetarea multilaterală a conţinutului biochimic al boabelor hibride, comparativ cu acela al boabelor liniilor consangvinizate, apare în consecinţă ca o necesitate obiectivă.

Avînd în vedere rolul important jucat de acizii nucleici în controlul proceselor metabolice ale organismului, îndeosebi în sinteza proteidelor şi în diviziunea celulară, ne-am propus să aprofundăm studiul asupra corelaţiei, sesizate de Bálint, între conţinutul în acizi nucleici şi fenomenul de heterozis.

Am stabilit conţinutul în acid ribonucleic (ARN) şi acid dezoxiribonucleic (ADN) al semînţelor de porumb ale unor linii parentale şi ale hibrizilor obţinuţi prin încrucişarea lor. Experienţele au cuprins un număr de 7 linii parentale şi 10 hibrizi (dintre care 8 prezentau fenomenul de heterozis şi 2 nu) din recolta 1961 şi un număr de 6 linii parentale şi 10 hibrizi (dintre care 8 cu şi 2 fără heterozis) din recolta 1962.

Pentru stabilirea conţinutului în ARN şi ADN în boabele de porumb, am experimentat mai întîi metoda descrisă de W. C. Schneider [14], care se bazează pe dozarea ribozei, respectiv a dezoxiribozei, în hidrolizatul acizilor nucleici. S-a constatat că nu se poate realiza o separare cantitativă prealabilă a poliglucidelor conţinînd pentoze din boabe, sau o hidroliză selectivă a acizilor nucleici, fără hidroliza concomitentă a poliglucidelor cu pentoze, obţinîndu-se astfel valori mult prea ridicate.

Din aceleaşi motive nu a putut fi aplicată nici metoda descrisă de C. Costache şi colaboratori [15].

Am experimentat în continuare metoda Schmidt şi Thanhauser [16], care dozează acidul fosforic corespunzător acizilor nucleici, după prealabila îndepărtare a altor compuşi ce conţin fosfor. Acestei metode i s-au putut aduce unele modificări care au permis ca ea

Tabela 1

Conținutul în acizi nucleici (mg 100 g material) al semințelor hibrizilor simpli de porumb comparativ cu conținutul liniilor consangvinizate parentale și cu capacitatea de producție a hibrizilor

Combinația hibridă	A R N				A D N				ARN + ADN				Capacitatea de producție în 1962 (% martor H.D.)
	(1) Conținut hibrid	(2) Conținut linia mamă	(3) Conținut linia tată	(4) % hibrid față de media părinți	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	
	RECOLTA 1961												
WA 162 × 37 A	377,89	356,90	311,64	113,0	184,52	167,45	164,12	111,3	562,41	524,35	475,76	112,4	111,6
WA 162 × W 9	373,86	356,90	364,85	103,6	189,37	167,45	216,34	98,6	563,23	524,35	581,19	101,8	49,5
WA 19 × W 9	337,61	271,89	364,85	106,0	189,37	174,42	216,34	96,9	526,98	446,31	581,19	102,4	24,6
WA 19 × 182 B	337,61	271,89	304,75	117,0	200,28	174,42	148,87	123,9	537,89	446,31	453,62	119,6	77,8
W 9 × A 344	420,29	364,85	265	133,4	248,15	216,34	171,90	127,8	668,44	581,19	436,90	131,2	92,4
153 R × 37 A	395,38	363,26	311,64	117,1	180,28	177,86	164,12	105,4	575,66	541,12	475,76	113,1	141,5
182 B × WA 162	432,69	304,75	356,90	130,7	219,37	148,87	167,45	138,6	652,06	453,62	524,35	133,4	89,5
182 B × 153 R	397,50	304,75	363,26	119,0	232,90	148,87	177,86	142,6	630,40	453,62	541,12	127,0	113,9
182 B × 37 A	378,10	304,75	311,64	122,7	215,63	148,87	164,12	137,8	593,73	453,62	475,76	127,9	100,4
182 B × W 9	422,41	304,75	364,85	126,1	244,11	148,87	216,34	133,6	666,52	453,62	581,19	128,9	88,2
	RECOLTA 1962												
A 344 × 153 R	339,20	336,55	349,80	98,8	166,14	199,87	166,34	90,7	505,34	536,42	516,14	95,9	76,2
A 344 × 37 A	426,65	336,55	365,91	121,4	234,92	199,87	169,07	127,3	661,57	536,42	534,98	123,5	106,5
A 344 × 182 B	403,01	336,55	365,70	114,7	215,13	199,87	204,52	106,3	618,14	536,42	570,22	111,6	108,4
W 9 × 182 B	388,49	352,98	365,70	108,1	238,76	228,46	204,52	110,3	627,25	581,44	570,22	108,9	103,8
W 9 × 153 R	365,17	352,98	349,80	103,9	239,87	228,46	166,34	121,5	605,04	581,44	516,14	110,4	105,1
W 9 × WA 19	349,27	352,98	299,98	106,9	214,52	228,46	164,12	109,3	563,79	581,44	464,10	107,8	71,3
153 R × 37 A	378,42	349,80	365,91	105,7	213,31	166,34	169,07	127,2	591,73	516,14	534,98	112,8	141,5
153 R × 182 B	377,04	349,80	365,70	105,3	213,31	166,34	204,52	115,0	590,35	516,14	570,22	108,7	142,7
182 B × 37 A	412,34	356,70	365,91	112,7	257,55	204,52	169,07	137,9	669,89	570,22	534,98	121,5	100,4
182 B × 153 R	384,78	365,70	349,80	107,5	219,37	204,52	166,34	118,3	604,15	570,22	516,14	111,3	113,9

Tabela 2

Conținutul în acizi nucleici (mg/100 g material) al semințelor hibrizilor simpli și al liniilor consangvinizate de porumb în dependență de anul obținerii lor

Linia sau hibridul	Semințele produse în anul					
	1961			1962		
	ARN	ADN	ARN + ADN	ARN	ADN	ARN + ADN
A 344	265	171,90	436,90	336,55	199,87	536,42
WA 19	271,89	174,42	446,31	299,98	164,12	464,10
W 9	364,85	216,34	581,19	352,98	228,46	581,44
153 R	363,26	177,86	541,12	349,80	166,34	516,14
37 A	311,64	164,12	475,76	365,91	169,07	534,98
182 B	304,75	148,87	453,62	365,70	204,52	570,22
153 R × 37 A	395,38	180,28	575,66	378,42	213,31	591,73
182 B × 153 R	397,50	232,90	630,40	384,78	219,37	604,15
182 B × 37 A	378,10	215,63	593,73	412,34	257,55	669,89

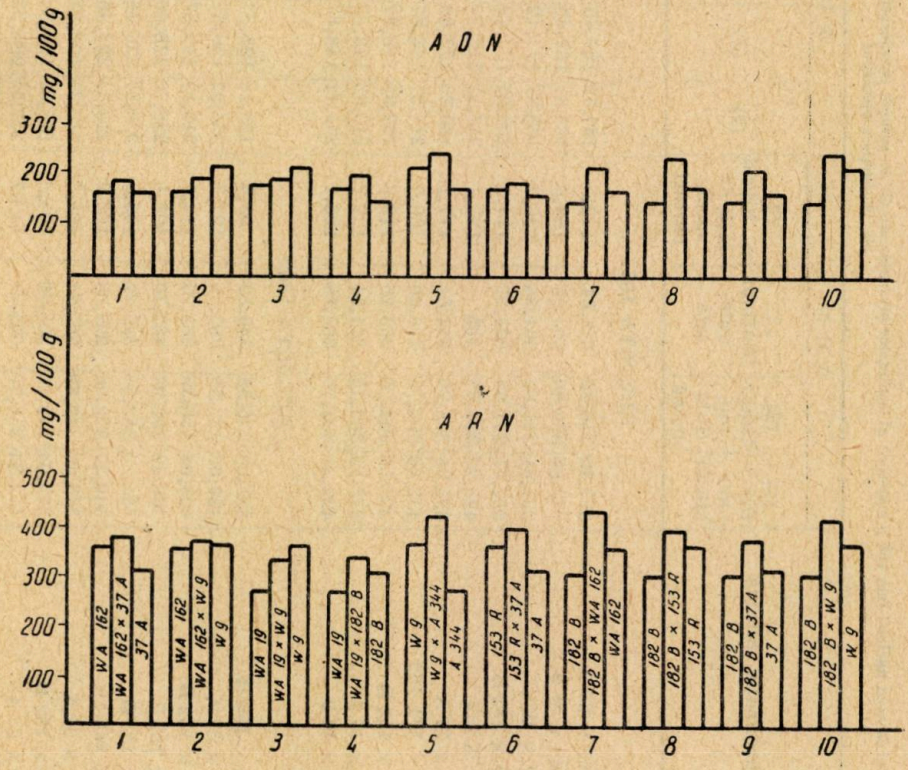


Fig. 1. — Conținutul în ARN și ADN (mg/100 g material) al semințelor liniilor parentale și al hibrizilor obținuți prin încrucișarea lor. Recolta 1961.

să fie aplicată cu rezultate deplin mulțumitoare la dozarea ARN și ADN din boabele de porumb. Modificarea esențială adusă metodei a constat în dozarea separată a acidului fosforic din ARN, respectiv ADN [17]. Celelalte modificări au fost făcute ținînd seama de indicațiile date de Hutchison și Munro [18].

Rezultatele obținute sînt trecute în tabelele 1 și 2 și în figurile 1 și 2.

DISCUTAREA REZULTATELOR

În tabela 1 sînt redate rezultatele privind : conținutul în acizi nucleici al semințelor de hibrizi simpli și linii parentale ; manifestarea heterozisului conținutului în acizi nucleici (conținut hibrizi în procente față de media părinților) și capacitatea de producție a hibrizilor, exprimată în procente față de un hibrid dublu (H.D. 103) considerat ca martor.

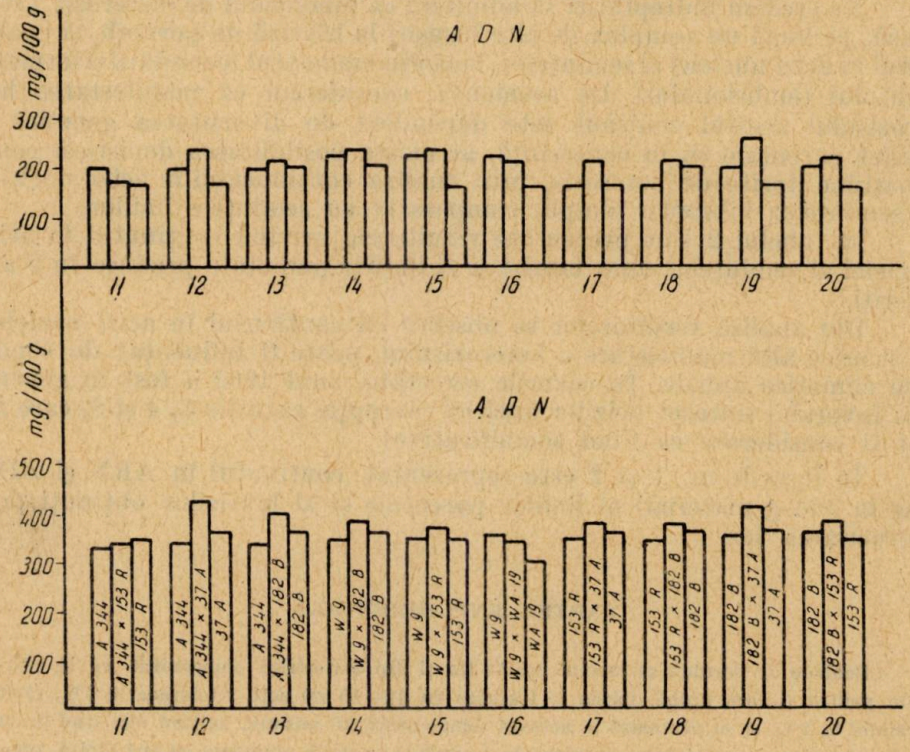


Fig. 2. — Conținutul în ARN și ADN (mg/100 g material) al semințelor liniilor parentale și al hibrizilor obținuți prin încrucișarea lor. Recolta 1962.

Din analiza rezultatelor se poate constata :

1. Combinațiile 2, 3, 41 și 16, realizate între linii parentale înrudite din punct de vedere genetic, care manifestă o capacitate de producție mai scăzută decît majoritatea restului hibrizilor, nu au realizat heterozis privind conținutul în acizi nucleici.

2. Restul combinaţiilor realizate între liniile neînrudite manifestă, în majoritate, o capacitate de producţie variind între 77,8 şi 142,7% faţă de hibridul dublu martor şi, paralel, un accentuat heterozis al conţinutului în acizi nucleici.

3. Pe baza datelor prezentate se poate afirma că sporirea conţinutului în acizi nucleici la seminţele hibrizilor simpli de porumb este o caracteristică a hibrizilor cu posibilităţi de manifestare a heterozisului, fără ca să existe însă un paralelism între creşterea conţinutului în acizi nucleici şi capacitatea de producţie.

4. Conţinutul în acizi nucleici al seminţelor hibride este în general sporit, în urma încrucişării, în comparaţie cu conţinutul seminţelor formelor materne care s-au polenizat cu polen propriu. Excepţiile cazurilor 11 şi 16 atrag atenţia asupra posibilităţii ca acest fenomen să nu se producă în urma încrucişării formelor înrudite.

Ne credem îndreptăţiţi să admitem că fenomenul de heterozis afectează, pe lîngă un complex de alte însuşiri la hibrizii de porumb, şi conţinutul în acizi nucleici al seminţelor, încă din momentul fecundării şi formării zigotului (embrionului). De asemenea, considerăm că manifestarea heterozisului acestui conţinut este dependent de diversitatea genetică a liniilor parentale şi, în consecinţă, ar exista posibilitatea depistării combinaţiilor lipsite de heterozis, prin analiza conţinutului în acizi nucleici al seminţelor hibrizilor simpli, comparativ cu seminţele liniilor.

În tabelul 2 sînt prezentate rezultatele privind conţinutul în acizi nucleici al seminţelor unor hibrizi şi al liniilor parentale produse în 2 ani diferiţi.

Din analiza rezultatelor se observă că conţinutul în acizi nucleici, ca şi orice altă manifestare a heterozisului, poate fi influenţat de condiţiile climatice anuale. În cazurile cercetate, anul 1962 a fost în general mai favorabil sintezei acizilor nucleici (excepţie cazurile 3, 4 şi 8, care nu pot fi considerate ca fiind semnificative).

În figurile nr. 1 şi 2 este reprezentat conţinutul în ARN şi ADN (mg la 100 g material) al liniilor parentale şi al hibrizilor obţinuţi prin încrucişarea lor.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Boabele de porumb se macină foarte fin şi din materialul omogenizat se ia cîte un gram pentru fiecare probă. Făina se tratează cu 10—15 ml acid tricloracetic 7%, răcit în prealabil la 0°C, şi se păstrează la această temperatură 20 minute, agitînd din cînd în cînd. După acest timp, materialul se filtrează la trompă şi se spală abundent cu apă răcită, pînă la îndepărtarea acidului tricloracetic, apoi cu puţin etanol şi eter etilic. Această operaţie are ca scop anihilarea acţiunii enzimelor şi îndepărtarea fracţiunii de fosfor acido-solubil.

După uscare, materialul se tratează cu un amestec de etanol-eter (3 : 1) şi se refluxează 2—3 minute pentru îndepărtarea fosforului lipidic şi a pigmenţilor. Amestecul se aduce cantitativ pe filtru cu ajutorul aceluiaşi amestec de solvenţi.

Materialul spălat cu amestecul de mai sus se usucă la temperatura camerei şi se tratează cu hidroxid de potasiu normal (10 ml la 1 g material vegetal) timp de 20 de ore. Acest

tratament are ca efect solubilizarea componenților țesuturilor, precum și hidroliza ARN la mononucleotide (ADN nefiind hidrolizat în aceste condiții). Pentru separarea celor două fracțiuni nucleice, hidrolizatului alcalin i se adaugă un amestec de HCl 6 N și acid tricloracetic 5% (2,5 ml — 10 ml), ceea ce determină precipitarea ADN, care se filtrează sau se centrifughează. Astfel, filtratul conține produsele de hidroliză ale ARN, iar precipitatul ADN-ul nehidrolizat.

Fracțiunea ADN este extrasă din precipitat prin încălzire timp de 15 minute la 90°C cu 15—20 ml acid tricloracetic 5%. Proteidele precipitate se separă prin filtrare, iar filtratul se aduce la un volum final de 25 ml.

Pentru transformarea fosforului organic în ortofosfat anorganic cîte 10 ml din cele două soluții ce conțin mononucleotidele ARN, respectiv ADN-ul nehidrolizat se mineralizează cu amestec sulfonitric (pînă la decolorarea completă a probelor). Se procedează la fel cu o probă standard de KH_2PO_4 (din care 1 ml conține 0,1 mg fosfor).

Determinarea acidului fosforic se face colorimetric după Fiske și Subbarow [18].

Calculul rezultatelor pentru ARN

$$\text{mg P ARN în probă} = \frac{\text{înălțimea soluției standard}}{\text{înălțimea soluției de analizat}} \times \text{conc. în P a standardului}$$

Se raportează la 50 ml extract și apoi la 100 g material. Cantitatea obținută se înmulțește cu 10,6 pentru aflarea cantității de ARN exprimată în mg la 100 de grame material.

Calculul rezultatelor pentru ADN

$$\text{mg P ADN în probă} = \frac{\text{înălțimea soluției standard}}{\text{înălțimea soluției de analizat}} \times \text{conc. în P a standardului}$$

Se raportează la 25 ml extract și apoi la 100 g material. Cantitatea obținută se înmulțește cu 10,1 pentru aflarea cantității de ADN exprimată în mg la 100 de grame material.

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj,
Catedra de biochimie,
Stațiunea experimentală agricolă Turda

Prezentată la redacție la 8 iulie 1963

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОСОБЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ КУКУРУЗЫ

СООБЩЕНИЕ III. ЯВЛЕНИЕ ГЕТЕРОЗИСА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ У ПРОСТЫХ ГИБРИДОВ МЕЖДУ ОДНОСОРТНЫМИ ЛИНИЯМИ КУКУРУЗЫ

РЕЗЮМЕ

Авторы путем определения фосфорной кислоты в рибонуклеиновой кислоте и в дезоксирибонуклеиновой кислоте установили содержание нуклеиновых масел в кукурузных зернах родительских линий и в гибридах, полученных путем скрещивания.

Всего было исследовано 7 родительских линий и 10 гибридов кукурузы урожая 1961 г., из которых у 8 наблюдался гетерозис, а у 2 он отсутствовал, а также и у 6 родительских линий и у 10 гибридов

урожая 1962 г., из которых у 8 наблюдалось явление гетерозиса, а у 2 это явление отсутствовало.

Полученные результаты показали, что в гибридах с возможностями явления гетерозиса содержится бóльшее количество рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислоты по сравнению с родительскими линиями, в то время как в гибридах без гетерозиса, содержание рибонуклеиновых кислот вообще не превосходит это содержание у родительских линий, более богатых нуклеиновыми кислотами. Не было отмечено параллелизма между повышением содержания нуклеиновых кислот и способностью к продукции.

На содержание нуклеиновых кислот оказывают влияние климатические ежегодные условия.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Содержание рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислоты (мг/100 г материала) в зернах родительских линий кукурузы и в зернах гибридов, полученных путем скрещивания; урожай 1961 года.

Рис. 2. — Содержание рибонуклеиновой кислоты и дезоксирибонуклеиновой кислоты (мг/100 г материала) в зернах родительских линий кукурузы и в зернах гибридов, полученных путем скрещивания; урожай 1962 г.

RECHERCHES SUR CERTAINS CARACTÈRES BIOCHIMIQUES SPÉCIAUX DU MAÏS

III. MANIFESTATION DE L'HÉTÉROSIS DES ACIDES NUCLÉIQUES CHEZ LES HYBRIDES SIMPLES ISSUS DE LIGNÉES CONSANGUINES DE MAÏS

RÉSUMÉ

On a établi la teneur en acides nucléiques par la détermination de l'acide phosphorique dans l'ARN et l'ADN des grains de maïs de certaines lignées parentales et des hybrides obtenus par leurs croisement. On a étudié 7 lignées parentales et 10 hybrides (dont 8 présentaient l'hétérosis) de la récolte de 1961 et 6 lignées parentales et 10 hybrides (dont 8 présentaient l'hétérosis) de la récolte de 1962.

Les résultats obtenus ont montré que les hybrides ont des possibilités de manifester l'hétérosis et qu'ils présentent alors une plus grande teneur en ARN, tout comme en ADN, en comparaison avec les lignées parentales, tandis que chez ceux ne présentant pas l'hétérosis, la teneur en acides nucléiques ne dépasse pas généralement celle du parent le plus riche en acides nucléiques. Par contre, on ne peut constater un parallélisme entre l'accroissement de la teneur en acides nucléiques et la capacité de production.

On note aussi que la teneur en acides nucléiques est influencée par les conditions climatiques annuelles.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Teneur en ARN et ADN (mg/100 matériel) des graines des lignées parentales et des hybrides obtenus par leur croisement. Récolte 1961.

Fig. 2. — Teneur en ARN et ADN (mg/100 g matériel) des graines des lignées parentales et des hybrides obtenus par leur croisement. Récolte 1962.

BIBLIOGRAFIE

1. RICHEY F., Adv. in Genetics, **3**, 159 (1950).
2. GRÜNVALD C., Analele rom.-sov., Seria agricultură, *2*, 7 (1958).
3. SPRAGUE G. F., *Corn and corn improvement*, Academic Press Inc. Publ., New York, 1955.
4. HAYES H., *Heterozis*, Ed. J. Gowen, 1952, p. 49.
5. ОВЕЧКИН С. К., СИМОЧКИНА Н. А., ДИМИТРИЕВА А. Н., ЗАЛЮБОВСКАЯ Н. П., Труды Укр. Инст. Раст. Сел. и Генетики. Харьков, том **IV**, 175—198 (1957).
6. GASPAR L., M. T. A. Mezögazdasági Kutato Intézeté Martonvásár, *7*, 199 (1961).
7. МАЦКОВ Ф. Ф., ОВЕЧКИН С. К., Труды Укр. Инст. Раст. Сел. и Генетики. Харьков, том **IV**, 167—174 (1959).
8. РУБЦОВА Н. С., Физиол. растений, *6*, 695—700 (1960).
9. МАЦКОВ Ф. Ф., МАНЗЮК С. Г., Труды Укр. Инст. Раст. Сел. и Генетики, том **IV**, 199—210 (1959).
10. МАЦКОВ Ф. Ф., МАНЗЮК С. Г., Труды Укр. Инст. Раст. Сел. и Генетики, том **IV**, 211—218 (1959).
11. BÁLINT A., M.T.A. Agrártudományok Osztályának Közleményei, *4*, 309 (1958).
12. BÁLINT A., KOVÁCS G., *Gheterozis*, Izd. Akad. N. B. SSR, Minsk, 1961, p. 50.
13. ТУРБИН Н. В., ГЕТЕРОЗИС, Изд. Акад. Наук Белорусской ССР, Минск, *3*, 34 (1961).
14. SCHNEIDER W. C., J. Biol. Chem., **161**, 293 (1945).
15. COSTACHE C. şi colab., St. cercet. chimie, Cluj, *1—4*, 167 (1956).
16. SCHMIDT G., THANHAUSER S. I., J. Biol., Chem., **161**, 1 (1945).
17. SCHNEIDER W. C., Biol. Chem., **164**, 747 (1946).
18. HUTCHISON W. C., MUNRO H. M., Analyst, **86**, 768 (1961).
19. FISKE C. H., SUBBAROW Y., J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).

DINAMICA MODIFICĂRILOR COMPOZIȚIEI MEDIULUI DE CULTURĂ ÎN CURSUL DEZVOLTĂRII *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

I. VARIAȚII ALE pH-ULUI, COMPONENTELOR AZOTATE, COMPONENTELOR FOSFORATE ȘI SUBSTANȚELOR REDUCĂTOARE

DE

AL. BULLA, EUG. PĂUNESCU și ECATERINA HADÎRCĂ

Bacteriile acido-alcoolo-rezistente au caracteristic un ritm de dezvoltare încetinit și o fază de lag mult prelungită. Această caracteristică este deosebit de evidentă la micobacteriile care dau tuberculoza mamiferelor [1], ceea ce — pentru diagnosticul bacteriologic al tuberculozei — constituie un important dezavantaj, perioada de timp necesară dezvoltării culturilor fiind de 3—6 săptămîni (sau mai mult) de la însămînțarea produsului patologic. Se poate gîndi, însă, că această perioadă de dezvoltare poate fi redusă, așa cum indică unele studii [2—5] care realizează multiplicarea micobacteriilor în diferite tipuri de culturi de celule, unde faza de lag este deosebit de redusă și faza de multiplicare foarte activă.

În acest sens, numeroși cercetători au căutat să modifice mediile de cultură pentru dezvoltarea bacilului tuberculozei, în vederea obținerii unei multiplicări rapide. Dintre acestea, amintim lucrările lui Barclay [6] care realizează prelungirea fazei logaritmice prin asigurarea unei mai bune oxigenări a mediului (Dubos), ale lui Coletsos [7] care accelerează faza de lag prin stimularea „efectelor respiratorii" cu ajutorul PAS-ului, ale lui Yamane [8] care utilizează Tween-ul 80 ca singură sursă de carbon, obținînd grăbirea dezvoltării bacilului, lucrările care folosesc extracte de gălbenuș de ou drept factor stimulant al creșterii [9] [10] etc.

Asemenea lucrări nu au condus însă la rezultate evident satisfăcătoare. Este probabil că, pentru obținerea unei modificări corespunzătoare a mediului, în vederea realizării condițiilor ce pot permite o mai rapidă dezvoltare a micobacteriilor virulente, este necesar să se intervină multi-

lateral în compoziţia mediului de cultură. În acest sens, noi gîndim că — pentru obţinerea indicaţiilor necesare precizării tipului de modificări ce trebuie aduse mediului de cultură — este deosebit de important să se cunoască cît mai exact modificările complexe pe care le provoacă în mediul de cultură bacilul, în cursul dezvoltării sale. Din compararea în dinamică a acestor modificări, cu curba multiplicării micobacteriei, devine posibil să se tragă concluzii importante.

În literatură există unele studii care au cercetat modificările mediului în raport cu vîrsta culturii. Astfel, Model şi colab. [11] au urmărit modificările reacţiei mediului, utilizarea glicerinei şi a oxalatului de amoniu, apariţia proteinelor în mediu. Ionescu-Mihăieşti şi colab. [12] au întreprins un studiu mai complex privind modificările, în funcţie de vîrstă, ale pH-ului, reziduului, fracţiilor azotate, puterii reducătoare, prezenţa aminoacizilor, apariţia proteinelor şi polizaharizilor. Aceste studii nu pot servi însă în mod direct scopului propus de cercetarea noastră, deoarece ele se referă la culturi vechi sau în plină dezvoltare (între 16 şi 75 de zile), necuprinzînd transformările survenite în cursul perioadei de lag şi la începutul fazei de multiplicare activă, momentele cele mai importante pentru a putea stabili condiţiile optime de mediu ce asigură dezvoltarea rapidă a micobacteriilor virulente.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetarea noastră a avut drept scop să surprindă modificările de mediu ce au loc în primele faze ale dezvoltării bacilului tuberculozei.

În acest scop, am utilizat un mediu lichid ce permite o dezvoltare mai rapidă a bacilului. Compoziţia şi prepararea mediului au fost descrise într-o lucrare anterioară [13].

Pentru studiu, am folosit tulpina umană $H_{37}Rv$ de *Mycobacterium tuberculosis*, pe care am însămînţat-o, folosind inoculuri cunoscute (echivalente cu 0,1 şi 1,0 mg microb uscat), în cantităţi definite de mediu. La intervale stabilite (3, 7, 12 şi 16 zile) au fost prelevate probe de cultură, care s-au filtrat prin Seitz EK, iar filtratele au fost folosite pentru determinarea variaţiilor de pH, ale componentelor azotate, ale celor fosforate şi celor reducătoare. În paralel, pentru comparaţie, s-au făcut aceleaşi determinări şi pe mediul neînsămînţat, considerat ca „martor" (determinările la „martor" ne-au servit şi pentru corecţia valorilor în funcţie de concentrarea mediului prin termostatare).

Aprecierea dezvoltării micobacteriei însămînţate s-a făcut nefelometric [13] şi a fost exprimată în mg microb uscat în 100 ml mediu.

Reacţia mediului (pH) a fost apreciată electric („Simplex-Ionometer").

Componentele azotate studiate au fost:

a) N-total, determinat prin metoda Kjeldahl [14].

b) N-acidosolubil, obţinut după eliminarea insolubilului precipitat cu acid tricloracetic în concentraţie finală de 5% [14], a fost de asemenea determinat prin metoda Kjeldahl.

c) N-acidoinsolubil a fost calculat prin diferenţa dintre N-total (*a*) şi N-acidosolubil (*b*).

d) N-aminic total a fost apreciat printr-o metodă colorimetrică, pusă la punct de unul din noi[1]).

[1]) EUG. PĂUNESCU, *Valoarea şi limitele unei metode colorimetrice de aprecire a N-aminic în produsele biologice*, Comunicare prezentată la Simpozionul privind „Standardizarea metodelor biochimice", U.S.S.M., Bucureşti, 1963.

e) N-asparaginic a fost apreciat prin aceeași metodă ca și N-aminic total, cu deosebirea că, în loc de etanol 96%, reluarea culorii dezvoltate s-a făcut în apă distilată, iar pentru fotometrare s-a folosit filtrul M.47 (470 mμ).

f) N-aminic nou format a fost determinat prin diferența dintre N-aminic total (*d*) și N-asparaginic (*e*).

g) N-acidosolubil neaminic este reprezentat de diferența dintre N-acidosolubil (*b*) și N-animic total (*d*).

Componentele fosforate studiate au fost:

a) P-total — determinat prin metoda colorimetrică Briggs, după prealabilă transformare în P-anorganic a întregului P conținut [14].

b) P-anorganic — determinat prin aceeași metodă colorimetrică, aplicată fără prealabilă incinerare în prezența acizilor sulfuric și azotic [14].

c) P-organic, fiind dificil de calculat prin diferența dintre P-total (*a*) și P-anorganic (*b*), din cauza concentrației sale deosebit de mici în condițiile noastre de lucru, a fost determinat pe cantități mari de filtrat (15—40 ml), după prealabilă precipitare a ortofosfaților [15] cu ajutorul reactivului citric-magnezian[1]).

Substanțele reducătoare au fost determinate prin metoda colorimetrică cu antronă [16], rezultatele fiind transpuse în echivalenți de glucoză.

Toate valorile obținute au fost exprimate în mg/100 ml filtrat de mediu de cultură.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 sînt prezentate, global, rezultatele cercetărilor întreprinse, privind variația componentelor de mediu în funcție de vîrsta culturii și de concentrația inoculului (echivalentul a 0,1 și 1,0 mg microb uscat) de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, tulpina $H_{37}Rv$.

După cum se observă, *dezvoltarea* (apreciată în mg microb uscat) este mai masivă în cazul inoculului mare (1 mg microb uscat), comparativ cu inoculul mic (0,1 mg microb uscat). De asemenea, după cum reiese și din figura 1, perioada de lag (apreciată nefelometric) este aparent mai scurtă (sub 3 zile) la inoculul mare, decît la cel mic (peste 3 zile); totuși, aspectul curbelor este în ambele cazuri ascendent.

Variațiile de pH ale mediului în funcție de vîrsta culturii (fig. 1) arată la început o creștere a alcalinității care — și în acest caz — este mai precoce la inoculul mare. Ulterior, după a 7-a zi în cazul inoculului mare și după a 12-a zi în cazul inoculului mic, alcalinitatea mediului scade. Panta curbei pH-ului este mai accentuată în cazul inoculului mare; fenomenul se desfășoară la fel și în cazul inoculului mic (0,1 mg), însă într-un ritm mai lent, foarte probabil datorită schimbului mai redus de metaboliți dintre celule și mediu, acesta din urmă prezentînd încă o eficientă putere tamponantă.

O evoluție similară a pH-ului mediului de cultură a fost observată și de alți autori [12], [17], care ajung la concluzia că scoborîrea valorii

[1]) 40 g acid citric se dizolvă, la cald, în 500 ml apă distilată, împreună cu 20 g oxid de magneziu. După răcire, se adaugă 670 ml amoniac ($d = 0,92$) și se completează la 1 500 ml cu apă distilată.

Tabela 1

Variațiile componentelor de mediu în funcție de vîrsta culturii și concentrația inoculului (echivalentul a 0,1 și 1,0 mg microb uscat, suspensie bacteriană de H_{37} Rv în 75 ml mediu) ; valorile sînt exprimate în mg/100 ml filtrat

Componenta determinată	Martor (mediu neînsămînțat)	Filtratul culturilor de							
		3 zile		7 zile		12 zile		16 zile	
		0,1 mg	1 mg	0,1 mg	1 mg	0,1 mg	1 mg	0,1 mg	1 mg
Microb uscat	—	0,75	4,50	3,75	20,25	16,50	31,25	29,00	41
pH-ul	7,05	7,10	7,20	7,20	7,35	7,25	7,20	7,20	6,95
N-total	45,8±0,05*)	44,4±0,4	42,3±0,1	43,6±0,15	41,6±0,05	42,8±0,00	40,4±0,1	42,0±0,05	40,4±0,2
N-acidosolubil	45,6±0,1	43,8±0,1	38,4±0,15	40,0±0,03	39,6±0,05	42,0±0,06	40,3±0,33	41,2±0,2	40,6±0,15
N-acidoinsolubil	0,2	0,6	3,9	3,6	2,0	0,8	0,1	0,8	—
N-aminic total	46±0,03	42,95±0,15	38,6±0,05	39,8±0,1	33,4±0,25	36,4±0,025	34,3±0,2	38,2±0,4	33,6±0,05
N-asparaginic	46±0,00	42,2±0,2	37,2±0,025	38,6±0,15	30,1±0,1	32,3±0,3	27,3±0,05	30,5±0,00	26,8±0,06
N-aminic nou format	—	0,75	1,4	1,2	3,3	4,1	6,9	5,7	6,8
N-acidosolubil neaminic	—	0,85	—	0,2	6,2	5,6	6,1	5,0	7,0
P-total	79	75	72	73	73	73,2	73	72,5	74
P-anorganic	79±0,06	75±0,08	72±0,45	73±0,18	72,5±0,1	73,2±0,25	72,0±0,05	72±0,1	73±0,2
P-organic	—	nedoz.	nedoz.	nedoz.	urme	urme	0,9	0,6	0,8
Substanță reducătoare (în echivalenți glucoză)	—	0,9±0,1	1,45±0,15	1,3±0,00	1,8±0,05	0,7±0,25	1,4±0,2	0,9±0,5	2,35±0,02

*) Abaterea medie

pH-ului în zona acidă netă (pH 6,0—5,0) traduce procese de autoliză celulară. Bekierkunst [18], cercetînd efectul pH-ului mediului asupra vitezei de creștere a bacililor tuberculozei proveniți din material patologic, constată că pH-ul optim (la care dezvoltarea este maximă) se situează între 6,5 și 6,0, existînd însă diferențe importante între tulpini și în funcție de chimiorezistența acestora.

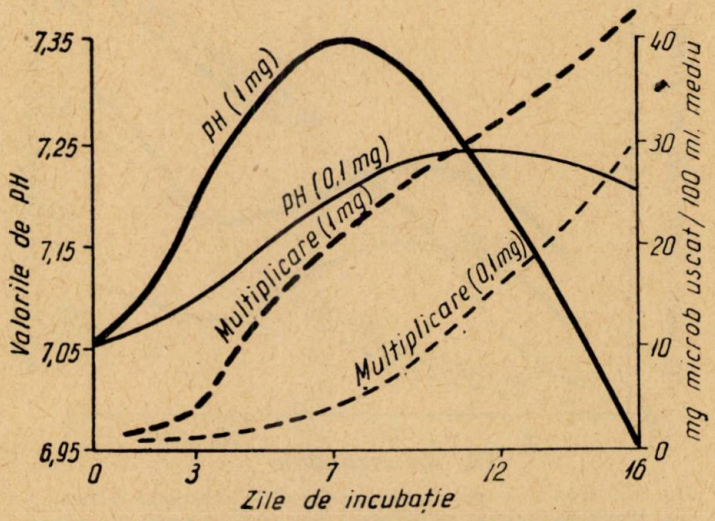


Fig. 1. — Dinamica variațiilor de pH ale mediului însămînțat cu cantități diferite (0,1 și 1 mg) de microb, comparativ cu dezvoltarea bacilului și în funcție de vîrsta culturii.

Apariția și variația conținutului în substanțe reducătoare (fig. 2), în funcție de vîrsta culturii, apreciate în dinamică, pentru cele două feluri de inoculuri, arată curbe similare ca aspect, dar diferite ca amplitudine. De remarcat că aceste substanțe apar în mediu încă la sfîrșitul fazei de lag, ceea ce — în experiența noastră — este evident în cazul inoculului mic (care la 3 zile nu permite încă o apreciere nefelometrică a multiplicării bacilului, însă arată prezență de substanțe reducătoare).

Modificările componentelor azotate ale mediului de cultură (fig. 3), în funcție de vîrsta culturii, prezintă unele aspecte deosebite. Și la aceste determinări trebuie remarcat de la început faptul că atît în cazul inoculului mare (1 mg), cît și în acel al inoculului mic (0,1 mg) fenomenul este similar, cu deosebirea că el se desfășoară mai repede și mai intens în culturile cu inocul mare. Astfel, în ambele cazuri, pe seama asparaginei (sursa majoră de N din mediu), celulele bacteriene obțin azotul necesar proceselor de anabolism; concomitent, pe măsura utilizării asparaginei, apar în mediu noi tipuri de aminoacizi și se constată prezența altor substanțe azotate, solubile sau insolubile în mediu puternic acid (tricloracetic 5%).

Ținînd seama de precocitatea apariției în mediu a altor tipuri de aminoacizi decît cei existenți în mediul inițial, este posibil să se utilizeze

acest proces drept indicator foarte timpuriu al începerii dezvoltării bacilare, cu condiţia de a avea certitudinea că în cultura respectivă nu există suprainfecţii.

Variaţiile componentelor fosforate (fig. 4) sînt de asemenea caracteristice pentru dinamica dezvoltării culturii de micobacterii. Astfel, este po-

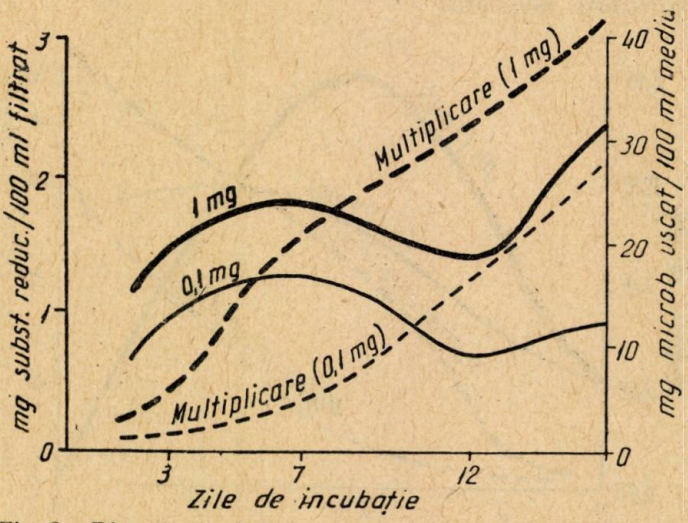


Fig. 2.—Dinamica variaţiei conţinutului în substanţe reducătoare din mediul însămînţat cu inocule diferite (0,1 şi 1 mg) din microb, comparativ cu dezvoltarea bacilului şi în funcţie de vîrsta culturii.

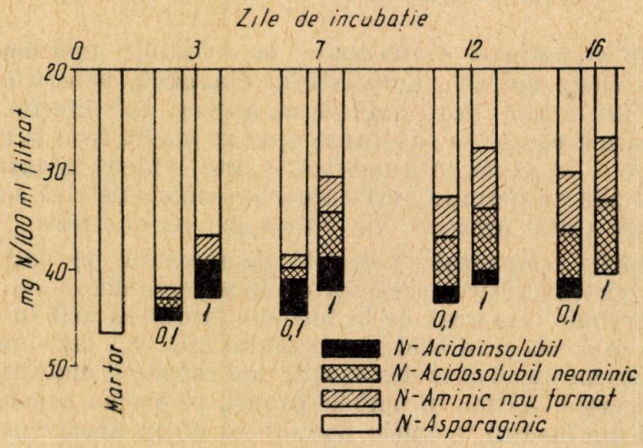


Fig. 3. — Dinamica modificărilor componentelor azotate ale mediului în funcţie de vîrsta culturii şi mărimea inoculului (0,1 şi 1 mg).

sibil să se constate un consum al ortofosfaţilor existenţi în mediu încă în cursul fazei de lag. Aşa cum au arătat Meissner şi Lemke [19], bacilul

tuberculozei prezintă — încă din prima fază de dezvoltare a culturii — o adsorbție preferențială a ortofosfaților și chiar a polifosfaților pînă la rangul 6—7; aceștia sînt acumulați în granulațiile intraprotoplasmatice, de unde sînt folosiți pentru sintezele structurilor macromoleculare intracelulare [20—22].

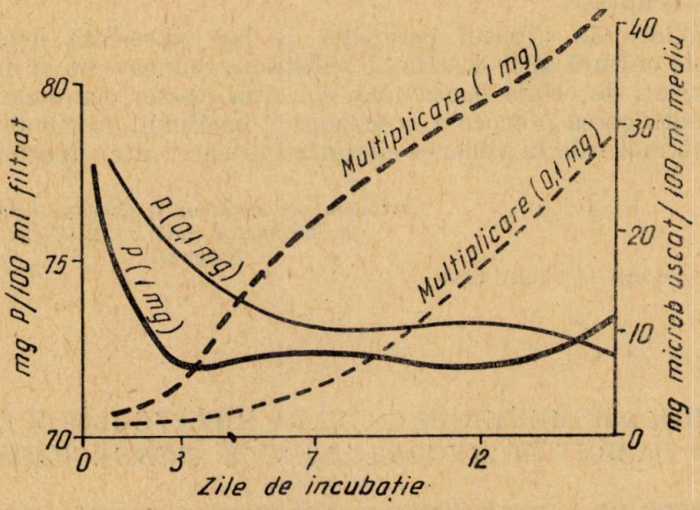


Fig. 4. — Dinamica modificărilor componentelor fosforate din mediu, comparativ cu dezvoltarea bacilului și în funcție de vîrsta culturii și mărimea inoculului (0,1 și 1 mg).

Un moment deosebit în dinamica variațiilor compușilor fosforați în mediu (fig. 4) îl constituie apariția componenților fosforați organici (probabil hexozo-fosfați), care denotă un intens proces anabolic intracelular, substrat al unei multiplicări bacilare masive. Aceasta coincide de altfel cu faptul că P-organic devine dozabil în filtratul culturilor în plină fază de multiplicare logaritmică (12 și respectiv 16 zile).

CONCLUZII

Studiul modificărilor compoziției mediului de cultură în cursul primelor faze de dezvoltare a bacilului tuberculozei arată că:

a) Modificările constatate interesează reacția (pH-ul) mediului, apariția și concentrația substanțelor reducătoare, componentele azotate (N-total și fracțiunile sale acidosolubile și acidoinsolubile; N-aminic total, inițial și nou format; N-acidosolubil neaminic) și componentele fosforate (P-organic și anorganic).

Între mediu și celula bacteriană există un continuu schimb selectiv de substanțe, ceea ce duce la dezvoltarea modificărilor de mediu enumerate.

b) Indiferent de cantitatea inoculului, aspectul proceselor de remaniere a compoziției mediului este același. Cu cît însă inoculul este mai

mare, cu atît este mai rapidă şi mai amplă desfăşurarea procesului de modificare a compoziţiei mediului de cultură.

c) Curba variaţiilor de pH în funcţie de mediul de cultură arată, într-o primă etapă, o creştere către alcalinitate a valorilor pH-ului, urmată apoi — în plină fază de multiplicare activă a culturii — de o scădere către aciditate.

d) Înainte de sfîrşitul perioadei de lag (apreciată nefelometric), în mediul de cultură apar o serie de substanţe reducătoare şi unii aminoacizi sintetizaţi de celula bacteriană. Apariţia acestor componente poate servi la identificarea precoce a multiplicării bacilului, cu condiţia de a se fi luat toate măsurile în vederea eliminării oricărei alte suprainfecţii.

Laboratorul de biochimie şi fiziologie bacteriană
al Institutului clinic de ftiziologie,
Bucureşti

Prezentată la redacţie la 9 iulie 1963

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ РАЗВИТИИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

СООБЩЕНИЕ I. ВАРИАЦИИ pH, АЗОТИСТЫХ КОМПОНЕНТОВ, ФОСФОРИСТЫХ КОМПОНЕНТОВ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

РЕЗЮМЕ

Анализ динамических изменений компонентов простой питательной среды (содержащей аспарагин в качестве единственного источника углерода и азота) в первом периоде развития *Mycobacterium tuberculosis* (стадия лаг и стадия размножения) указал на:

а) повышение pH с последующим его снижением в кислой зоне;

б) снижение количества аспарагина и появление новых азотистых производных, среди которых вновь образованный аминовый азот;

в) раннее использование ортофосфатов и позднее появление органического фосфора (гексозо-фосфатов);

г) раннее появление в среде восстанавливающих производных.

Некоторые изменения состава среды, как например появление новых аминокислот из восстановительных веществ, могут служить ранним показателем начала размножения туберкулезных микобактерий (до обнаружения этого роста невооруженным глазом). Эти показатели могут быть использованы на практике для ранней идентификации развития патогенных микобактерий с условием, однако, достоверности того, что питательная среда не была заражена другими микроорганизмами.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Динамика вариаций pH питательной среды, засеянной различными количествами (0,1 и 1 мг) туберкулезных микобактерий, по сравнению с их размножением, а также и в зависимости от возраста культуры.

Рис. 2. — Динамика вариаций содержания восстановительных веществ в питательной среде, засеянной различными количествами (0,1 и 1 мг) туберкулезных микобактерий, по сравнению с их размножением и в зависимости от возраста культуры.

Рис. 3. — Динамика изменений азотистых компонентов питательной среды в зависимости от возраста культуры и от количества засеянных микобактерий (0,1 и 1мг).

Рис. 4. — Динамика изменений фосфорных компонентов питательной среды по сравнению с размножением микобактерий и в зависимости от возраста культуры, а также от количества засеянных микобактерий (0,1 и 1 мг).

DYNAMIQUE DES MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

I. VARIATIONS DU pH, DES COMPOSANTS AZOTÉS ET PHOSPHORÉS ET DES SUBSTANCES RÉDUCTRICES

RÉSUMÉ

L'analyse des modifications des composants d'un milieu simple (à l'asparagine comme seule source de carbone et d'azote) dans la première période du développement du *Mycobacterium tuberculosis* (la phase de «lag» et la phase de multiplication) montre : *a*) un accroissement du pH, suivi d'un décroissement dans la zone acide ; *b*) la réduction de la quantité d'asparagine et l'apparition de nouveaux composés azotés, dont quelques-uns contenant de l'azote aminique nouvellement formé ; *c*) la consommation précoce des ortho-phosphates et l'apparition retardée du phosphore organique (hexoso-phosphates) ; *d*) l'apparition précoce de composants réducteurs dans le milieu.

Certaines de ces modifications de la composition du milieu — telle l'apparition de nouveaux acides aminés et de substances réductrices — peuvent constituer un indicateur précoce du début de la multiplication du bacille de la tuberculose (avant l'observation de la croissance à l'œil nu) et peuvent être utilisées dans la pratique pour l'identification rapide du développement des mycobactéries pathogènes, à la condition d'avoir la certitude que le milieu n'a pas été surinfecté par d'autres micro-organismes.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Dynamique des variations de pH du milieu ensemencé avec des quantités variées (0,1 et 1 mg) de microbe, par comparaison à la multiplication du bacille et en fonction de l'âge de la culture.

Fig. 2. — Dynamique de la variation de la teneur en substances réductrices du milieu inoculé avec 0,1 et 1 mg de microbe, par comparaison à la multiplication du bacille et en fonction de l'âge de la culture.

Fig. 3. — Dynamique des modifications des composants azotés du milieu en fonction de l'âge de la culture et de la dose d'inoculation (0,1 et 1 mg).

Fig. 4. — Dynamique des modifications des composants phosphorés du milieu, par comparaison à la multiplication du bacille et en fonction de l'âge de la culture et de la dose d'inoculation (0,1 et 1 mg).

BIBLIOGRAFIE

1. EUG. PĂUNESCU, G. ALGEORGE, AL. ESKENASY, A. CIOLAC, Gh. PISICĂ, Probleme de tuberculoză, 1963, vol. IV (sub tipar).
2. E. SUTER, J. Exp. Med., **97**, 235 (1953).
3. C. C. SHEPART, J. Exp. Med., **107**, 237 (1958).
4. V. D. STIBEN, L. I. TROFIMOVA, J. Mikobiol., Epidemiol., Immunobiol., *2*, 125 (1959).
5. G. DONA, D. DONA, Microbiol., Parazitol., Epidemiol., *1*, 47 (1962).
6. W. R. BARCLAY, J. Lab. Clin. Med., **46**, 651 (1955).
7. P. J. COLETSOS, Ann. Inst. Pasteur, **97**, *2*, 135 şi **97**, *3*, 290 (1959).
8. I. YAMANE, K. MINAMI, T. YASNI, C. R. Soc. Biol., **148**, *7—8*, 769 (1954).
9. J. H. HIRSCH, Amer. Rev. Tuberc., **70**, *6*, 977 (1954).
10. K. YAMAMURA, Kekkaku, **32**, 440 (1957).
11. L. M. MODEL, *Biologia i biohimia tuberkuloznîh mikobakterii*, Medghiz, Moscova, 1952.
12. C. IONESCU-MIHĂIEŞTI, A. DÎMBOVICEANU, E. PAPAZIAN, E. SORU, E. RĂDULESCU, B. WISNER, G. GANCEVICI, St. cercet. inframicrobiol., microbiol., parazitol., *4*, *3—4*, 409 (1953).
13. EUG. PĂUNESCU, P. GEORGESCU, Ftiziologia, **2**, 141 (1958).
14. P. GEORGESCU, EUG. PĂUNESCU, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. Medicală, Bucureşti, 1960.
15. H. EULER, K. MYRBACK, Liebigs Ann., **464**, 56 (1928).
16. H. J. ROE, J. Biol. Chem., **212**, 335 (1955).
17. J. BANCE, Arch. Inst. Pasteur de Tunis, **29**, 463 (1940).
18. A. BEKIERKUNST, Schweiz. Z. allg. Path. Bakt., **20**, 312 (1957).
19. J. MEISSNER, J. LEMKE, Jahresbericht. Tuberk. Forsch. Inst. Borstel, **3**, 542 (1954/55).
20. E. BUKHOVICI, A. N. BELOZERSKI, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **124**, 1147 (1959).
21. A. MUHAMMED, A. RODGERS, D. E. HUGHES, J. Gen. Microbiol., **20**, 482 (1959).
22. G. N. ZAITEVA, A. N. BELOZERSKI, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **132**, 1950 (1960).

FACTORI DE CONTROL AL VITEZEI OXIDĂRII SUCCINATULUI ÎN MITOCONDRII DIN FICAT DE ȘOBOLAN

DE

ELENA CRISTEA, C. GURBAN și ILEANA MITU

Pînă de curînd se considera că cel mai important factor care controlează vitezele reacțiilor în ciclul acizilor tricarboxilici este concentrația ADP-ului[1]) și a fosfatului anorganic [1]. Situația particulară a succinatului, anume posibilitatea inhibiției oxidării sale de către unul din intermediarii ciclului — oxalacetat, pe de o parte [2], și capacitatea lui de a reduce NAD-ul într-o măsură chiar mai mare decît substratele legate direct de NAD [3], pe de altă parte, a pus problema rolului succinatului în reglarea vitezelor de reacție în ciclul acizilor tricarboxilici [4], [5].

Inhibiția oxidării succinatului de către oxalacetat, cunoscută încă din 1937 [2], este astăzi unanim admisă ca o proprietate a succindehidrogenazei [6]. Problema dacă în sistemele enzimatice complexe — omogenate, mitocondrii — unde se constată uneori inhibiția oxidării succinatului, se formează oxalacetat, sau dacă oxalacetatul este responsabil pentru inhibiție, este foarte mult controversată. Pardee și Potter [7] și Tyler [8] constată inhibiția oxidării succinatului de către oxalacetat, atît pe omogenate cît și pe mitocondrii; această inhibiție este înlăturată în prezența de ATP [7], [8] sau de Mg^{++} și EDTA [8].

Grupul lui Ernster și al elevilor săi, admițînd că succinatul nu este oxidat decît după ce a fost transformat într-o formă activă (9), nu atribuie oxalacetatului un rol inhibitor prin el însuși. În cazurile în care se formează oxalacetat, oxidarea succinatului este inhibată prin depleția sistemelor în intermediari macroergici [9], [10], [11].

Slater și școala sa susțin că, în preparatele mitocondriale, în prezență de succinat se formează oxalacetat și că acesta are acțiune inhi-

[1]) Prescurtările utilizate sînt următoarele: ADP = adenozindifosfat; ATP = adenozintrifosfat; NAD = nicotinamidadenin-dinucleotid oxidat; $NADH_2$ = nicotinamidadenin-dinucleotid redus; EDTA = etilendiamintetraacetat.

bitorie, chiar atunci cînd concentraţia oxalacetatului este sub limita de sensibilitate a metodelor analitice [12].

Williams [13] constată că mitocondriile pretratate timpuri scurte cu *2, 4*-dinitrofenol nu respiră la adaus de succinat şi admite că inhibiţia este determinată de oxalacetatul format în cursul preparării mitocondriilor din substratele endogene. Mai observă că, după incubare prelungită, viteza respiraţiei creşte, atingînd după 40 de minute circa 50% din viteza respiraţiei obţinută în prezenţă de ATP sau de acid cistein-sulfinic (care îndepărtează oxalacetatul [6]).

Chance nu a obţinut inhibări ale oxidării succinatului şi nu a admis formarea oxalacetatului în mitocondrii [14], pînă într-o lucrare recentă [5], cînd constată că mitocondriile cu un control respirator scăzut se inhibă după ce oxidează o cantitate mică de succinat.

În lucrarea de faţă prezentăm experienţe din care rezultă că oxidarea succinatului în mitocondrii se inhibă, după un timp, în urma formării oxalacetatului. Mai mult decît atît, în experienţele noastre am constatat că respiraţia se reactivează spontan, uneori pînă la vitezele iniţiale, şi acest ciclu inhibiţie-activare se repetă de mai multe ori.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat cu mitocondrii din ficat de şobolan, izolate după tehnica descrisă într-o lucrare anterioară [15], cu deosebirea că mediul de izolare şi suspendare a fost manitolul 0,3 M [14]. Proteinele mitocondriale au fost dozate prin metoda biuretului, modificată de Aldridge [16]. Consumul de oxigen a fost măsurat cu tehnica manometrică Warburg. Mediul de incubaţie „standard" a avut următoarea compoziţie: tampon fosfat de potasiu 15 mM, pH 7,4; $MgSO_4$ 6,7 mM; citocrom *c* 0,02 mM; EDTA 1 mM; zaharoză 0,1 M; KF 14 mM; *2,4*-dinitrofenol 0,02 mM; ATP 0,5 mM; succinat 10—30 mM. Cu excepţia *2,4*-dinitrofenolului, aceasta este compoziţia mediului folosit curent în experienţele de fosforilare oxidativă. Suspensia de mitocondrii (14 mg) a fost răsturnată din diverticul după 5 min. de termoechilibrare la 25°C şi s-a început măsurarea consumului de oxigen. Citirile s-au făcut din 5 în 5 min. Volum final 2 ml.

În unele experienţe s-a variat concentraţia *2,4*-dinitrofenolului, a ATP-ului, sau s-a mai adăugat NAD, glutamat, arsenit, malonat, oxalacetat. Modificarea condiţiilor „standard" se va preciza acolo unde este cazul.

REZULTATE

În condiţiile descrise mai sus, urmărindu-se consumul de oxigen timp de 60—90 min., s-au obţinut inhibiţii şi activări spontane şi repetate ale respiraţiei mitocondriale. În figura 1 este prezentată o curbă tipică, obţinută cu succinat 30 mM. S-a înscris viteza respiraţiei (în μ atomi O_2), în funcţie de timp (în minute). Respiraţia începe cu o viteză de circa 4μ atomi O_2/5 min. şi rămîne relativ constantă 35 min. Din minutul 35 începe scăderea vitezei consumului de oxigen, astfel că în următoarele 10 min. acesta se reduce la mai puţin de 25% din viteza iniţială (la 45 min. $\Delta O = 0{,}77$ μ atomi O_2/5 min.). Sistemul rămîne puţin timp inhibat,

apoi viteza respirației crește, iar după alte 15 min. atinge viteza inițială. Urmează o nouă scădere a vitezei consumului de oxigen (ΔO minim de 1,16 μ atomi O_2/5 min), o reactivare și apoi o nouă inhibiție.

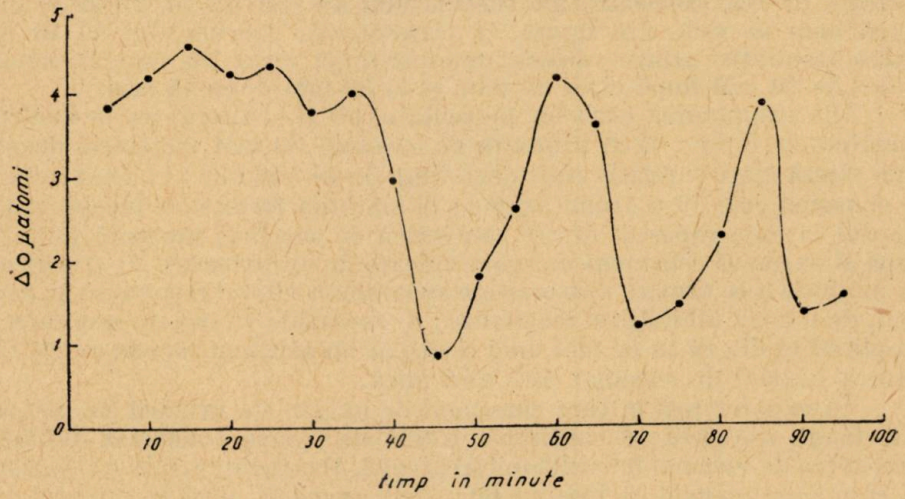


Fig. 1. — *Variația vitezei respirației mitocondriilor în prezență de succinat 30 mM.* Mediul de incubație cuprinde : tampon fosfat de potasiu, pH 7,4, 15 mM ; $MgSO_4$ 6,7 mM ; citocrom *c* 0,02 mM ; EDTA 1 mM ; zaharoză 0,1 M ; KF 14 mM ; *2,4*-dinitrofenol 0,02 mM ; ATP 0,5 mM ; succinat 30 mM ; 14 mg proteină mitocondrială. Volum final 2 ml. Temperatura 25°C.

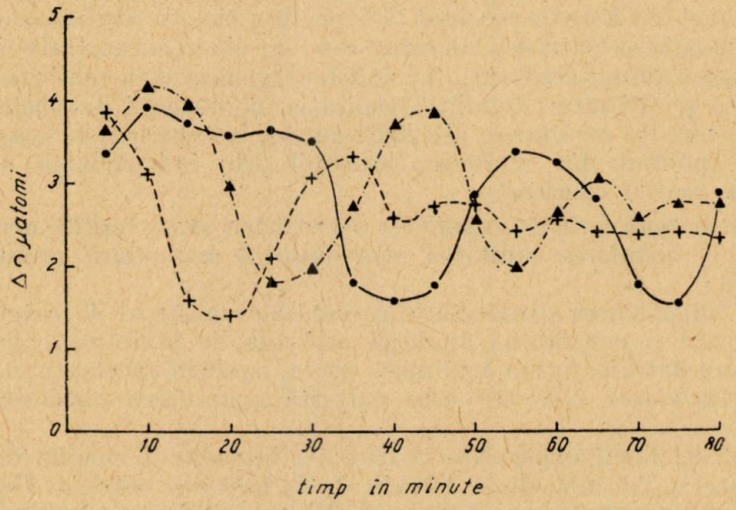


Fig. 2. — *Variația vitezei respirației mitocondriilor în funcție de concentrația succinatului.*

Condiții de incubare ca în figura 1. Concentrația succinatului a fost : curba + – – – + – – – + 10 Mm ; curba ▲ – . – ▲ – . – ▲ 20 mM ; curba ● ——— ● ——— ● 30 mM.

Curbe similare se obțin și cu concentrații mai mici de succinat, însă prima inhibiție începe după un interval de timp mai mic, în funcție de concentrația succinatului. În figura 2 sînt prezentate rezultatele unei experiențe în care concentrațiile succinatului au fost de 10, 20 și 30 mM. După cum se vede din figură, la concentrația succinatului de 10 mM viteza respirației atinge valoarea minimă după circa 20 min, la concentrația de 20 mM după circa 25 min și la 30 mM după 45 min.

Din examinarea curbelor prezentate, cît și a altora, ies în evidență următoarele fapte : *a*) în prezență de succinat 30 mM respirația decurge cu o viteză mare și relativ constantă timp de 40—50 min ; în acest interval se consumă cca. 39 μ atomi oxigen ; *b*) inhibiția respirației începe în momentul în care raportul dintre cantitatea de succinat prezentă inițial în cupă și oxigenul consumat atinge o valoare de aproximativ 2 ; *c*) perioada de inhibiție este urmată de o creștere spontană a vitezei respirației și, eventual, de o nouă inhibiție și reactivare ; *d*) oscilațiile vitezei de respirație au amplitudini din ce în ce mai mici și dispar cu atît mai repede cu cît cantitatea inițială de succinat este mai mică.

În experiențele în care consumul de oxigen s-a urmărit pe perioade mai lungi, s-a găsit că cantitatea totală de oxigen consumat depășește cantitatea de succinat prezentă inițial în cupă. De exemplu, într-o experiență în care s-au adăugat la început 60 μ moli succinat, pînă în minutul 110, cînd s-a încheiat experiența, s-au consumat 75 μ atomi oxigen. Viteza consumului de oxigen după 105 min mai era încă de 3 μ atomi O_2/5 min. Aceasta înseamnă că, cel puțin parțial, fumaratul rezultat prin oxidarea succinatului este oxidat mai departe. (În experiențe de control s-a constatat că mitocondriile respiră, atît cu fumarat, cît și cu malat, ca substrate adăugate.) Este de așteptat să avem de a face cu șirul de reacții : succinat→fumarat→malat→oxalacetat→→, iar cînd concentrația oxalacetatului atinge o anumită valoare, succindehidrogenaza să fie inhibată. În acest fel explică și alți autori inhibiția respirației în prezență de succinat. Însă, spre deosebire de rezultatele celorlalți autori, în experiențele noastre sistemul iese spontan din inhibiție, probabil prin îndepărtarea oxalacetatului prin reacții colaterale.

Într-o nouă serie de experiențe s-a urmărit să se verifice următoarele puncte : 1) instalarea inhibiției este datorită acumulării oxalacetatului în sistem ;

2) îndepărtarea oxalacetatului menține consumul de oxigen la valori crescute și constante ; 3) după perioada de inhibiție, consumul de oxigen este datorit, în cea mai mare parte, oxidării succinatului.

1) *Instalarea inhibiției* este datorită acumulării oxalacetatului în sistem.

a) S-au făcut experiențe în care s-a introdus în mediul de incubație oxalacetat 2,5 mM, după 15 min de la inițierea reacției. După adăugarea oxalacetatului se constată o inhibiție rapidă și pronunțată a respirației, pînă la 1/7—1/8 din viteza inițială. După un timp, viteza respirației crește, atingînd chiar viteza inițială. Spre exemplu, într-o experiență, în cele 5 minute care preced adăugarea oxalacetatului $\Delta O = 4{,}6$ μ atomi O_2/5 min ; în următoarele 5 minute după adăugarea oxalacetatului,

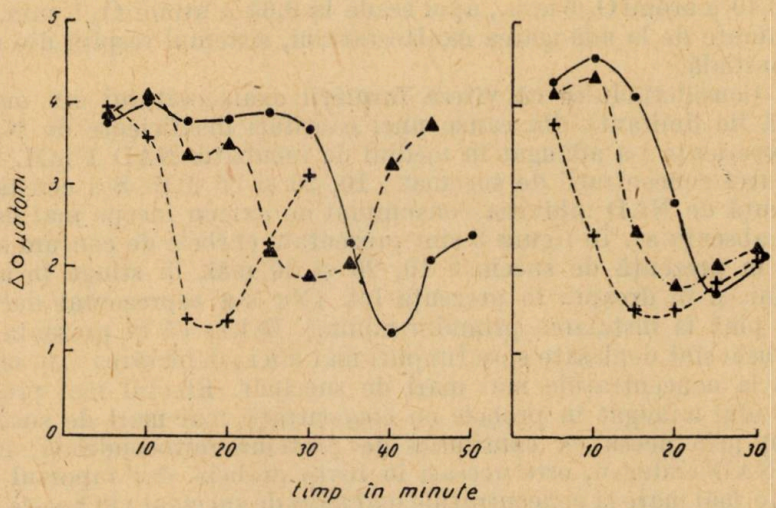


Fig. 3. — *Vitezele inhibării respirației mitocondriilor cu succinat în absență de NAD (stînga) și în prezență de 1 mM NAD (dreapta).*

Condiții de incubare ca în figura 1. În stînga s-a adăugat NAD 1 mM. Concentrația succinatului a fost curba + – – – + – – – + 10 mM; curba ▲ – . – ▲ – . – ▲ 20 mM; curba ● ——— ● ——— ● 30 mM.

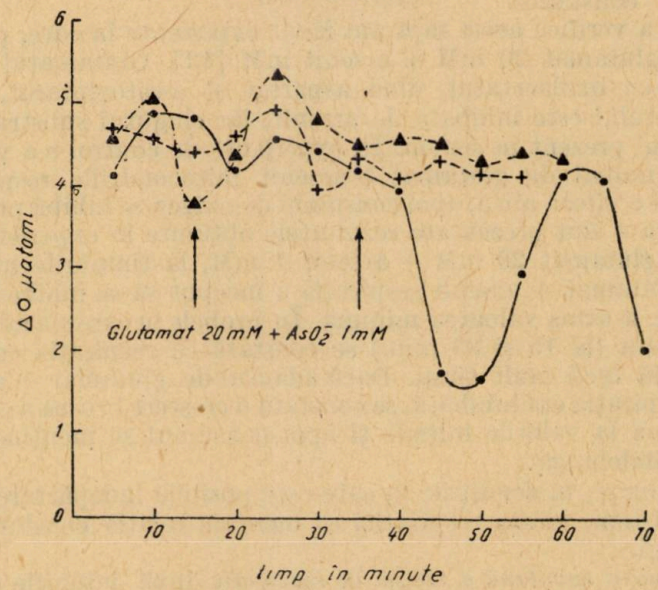


Fig. 4. — *Efectul adăugării de glutamat + arsenit asupra respirației mitocondriilor cu succinat.*

Condiții de incubare ca în figura 1. Concentrația succinatului 30 mM. Curba ● ——— ● ——— ● fără glutamat + arsenit; curba ▲ – . – ▲ – . – ▲ cu glutamat 20 mM + arsenit 1 mM adăugat la 15 minute. Curba + – – – + – – – + cu glutamat 20 mM + arsenit 1 mM adăugat la 35 de minute.

ΔO = 2,40 μ atomi O_2/5 min., apoi scade la 0,64 μ atomi O_2/5 min. După 40 de minute de la adăugarea oxalacetatului, sistemul respiră din nou cu viteza inițială.

b) Considerîndu-se că viteza formării oxalacetatului din malat ar putea să fie limitantă din cauza unei cantități insuficiente de NAD, în unele experiențe s-a adăugat în mediul de incubație NAD 1 mM. S-a lucrat cu trei concentrații de succinat: 10, 20 și 30 mM. S-a constatat că în prezență de NAD inhibiția consumului de oxigen începe mai devreme decît în absența sa. În figura 3 sînt prezentate curbele de consum ale oxigenului în prezență de succinat 10, 20 și 30 mM, în stînga în absența NAD-ului, și în dreapta în prezența lui. (Nu s-a reprezentat decît faza inițială, pînă la instalarea primului minim). Reiese că în prezența NAD-ului curbele sînt deplasate spre timpuri mai mici; deplasarea este mai pronunțată la concentrațiile mai mari de succinat. Efectul mai pronunțat al NAD-ului adăugat în probele cu concentrații mai mari de succinat îl explicăm prin aceea că cantitatea de proteină mitocondrială, inclusiv cea de NAD endogen, este aceeași în toate probele, dar raportul malat/NAD este mai mare la concentrațiile mai mari de succinat; în aceste cazuri, oxidîndu-se mai mult succinat, se formează și malat în cantitate mai mare.

Prin urmare, în condiții în care viteza reacțiilor de formare a oxalacetatului este crescută, respirația se inhibă mai repede.

2) *Indepărtarea oxalacetatului* menține consumul de oxigen la valori mari și constante.

Pentru a verifica acest fapt am făcut experiențe în care, pe parcurs, s-a adăugat glutamat 20 mM + arsenit mM [12]. Glutamatul transaminează rapid cu oxalacetatul, dînd aspartat și α-cetoglutarat. Oxidarea α-cetoglutaratului este inhibată de arsenit, iar singurul substrat oxidabil este succinatul prezent în sistem. În experiențe de control s-a verificat că în prezență numai de glutamat + arsenit mitocondriile respiră numai 5—10 min. cu o viteză mică, apoi consumul de oxigen se inhibă practic complet. În figura 4 sînt prezentate rezultatele obținute în experiențe în care s-a introdus glutamat 20 mM + arsenit 1 mM, la timpurile indicate. În proba fără glutamat + arsenit respirația a început să se inhibe la 40 min, iar la 50 min. a atins valoarea minimă. În probele în care s-a adăugat glutamat + arsenit (la 15 și 35 min.) se constată că respirația continuă cu viteză ridicată încă mult timp. Dacă adausul de glutamat + arsenit s-a făcut cînd respirația era inhibată, se constată o creștere bruscă a consumului de oxigen pînă la valorile inițiale și apoi consumul se menține la aceste valori timp îndelungat.

Prin urmare, în condițiile în care este posibilă îndepărtarea oxalacetatului din sistem, viteza respirației se menține relativ constantă pentru perioade lungi.

3) *Creșterea spontană a vitezei de respirație* după inhibiție este determinată de oxidarea succinatului și nu a vreunui alt compus.

Pentru a verifica acest punct am făcut experiențe în care s-a introdus malonat 20 mM în momentul cînd respirația era inhibată. În figura 5 sînt prezentate trei experiențe în care malonatul a fost introdus la 35, 40 respectiv 45 min. de la începerea experienței. Consumul de oxigen se menține

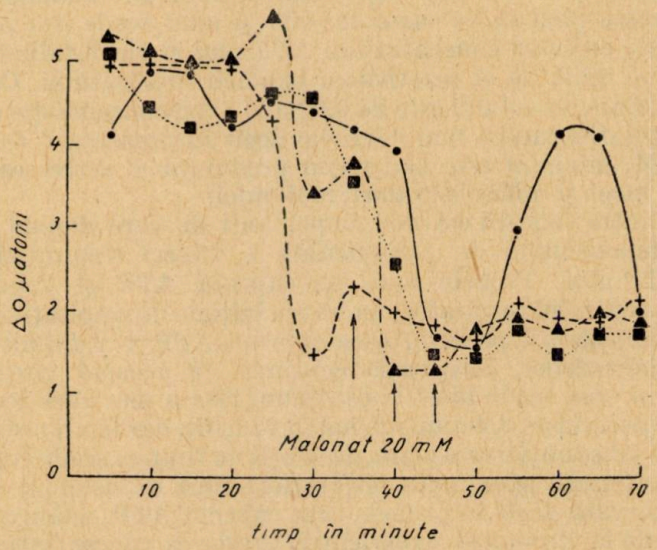


Fig. 5. — *Efectul adăugării de malonat asupra respirației mitocondriilor cu succinat.*

Condiții de incubare ca în figura 1. Concentrația succinatului 30 mM. Curba ●——●——● fără malonat; curba +– – –+– – –+ cu malonat 20 mM adăugat la 35 de minute. Curba ▲–.–▲–.–▲ cu malonat 20 mM adăugat la 40 de minute. Curba ■– – –■– – –■ cu malonat 20 mM adăugat la 45 de minute.

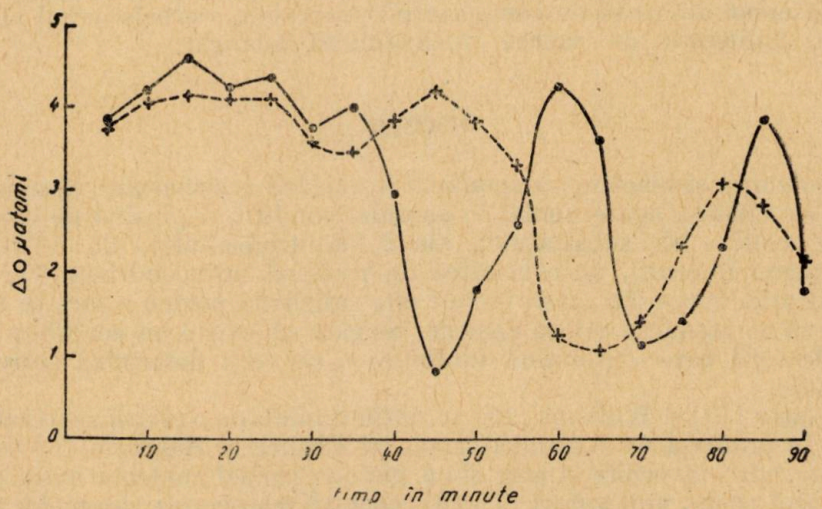


Fig. 6. — *Variația vitezei respirației mitocondriilor cu succinat în funcție de concentrația ATP-ului.*

Condiții de incubare ca în figura 1. Concentrația succinatului 30 mM. Curba ●——●——● cu ATP 0,5 mM; curba +– – –+– – –+ cu ATP 3,5 mM.

la valori mici, de 1,5—2 μatomi O_2/5 min. În proba fără malonat, consumul de oxigen creşte pînă la valoarea iniţială şi apoi scade din nou.

S-au mai cercetat concentraţiile ATP-ului şi ale *2,4*-dinitrofenolului la care are loc inhibiţia şi reactivarea oxidării succinatului. Concentraţia optimă a *2,4*-dinitrofenolului este de 0,02 mM; la o concentraţie de 0,04 mM inhibiţia respiraţiei începe mai devreme decît în prezenţa *2,4*-dinitrofenolului 0,02 mM, minimul este mai puţin pronunţat şi activarea respiraţiei are loc mai încet şi pînă la valori mai mici.

Unul dintre factorii cei mai importanţi de care depind apariţia şi caracterele fenomenului de periodicitate a vitezei respiraţiei este concentraţia ATP-ului. Probele care nu cuprind ATP şi *2,4*-dinitrofenol (probe pentu controlul respirator) au viteze iniţiale de respiraţie de 1/3—2/3 din vitezele iniţiale ale probelor care cuprind ATP + *2,4*-dinitrofenol sau numai *2,4*-dinitrofenol. Respiraţia continuă cu această viteză timp de 50—60 min. şi apoi scade încet şi continuu, fără a mai avea loc o creştere a vitezei. În prezenţă de *2,4*-dinitrofenol (0,02 mM), dar în absenţa ATP-ului, viteza iniţială a respiraţiei este mare, dar după un timp ea scade continuu, fără reactivare. Activarea spontană a respiraţiei, după ce sistemul s-a inhibat, nu a fost observată decît în probele care cuprind ATP, adăugat în mediul de incubaţie de la începutul experienţei. Creşterea concentraţiei ATP-ului în mediul de incubaţie, de la 0,25 mM la 3,5 mM, duce la întîrzierea instalării inhibiţiei, însă comportarea ulterioară a sistemelor rămîne aceeaşi. În figura 6 sînt prezentate curbele de variaţie a consumului de oxigen în prezenţă de ATP 0,5 mM şi 3,5 mM. Concentraţia succinatului este de 30 mM. După cum rezultă din figură, se constată o amînare a inhibiţiei oxidării succinatului cu 20 min. la concentraţia mare de ATP. În unele experienţe, în loc de ATP s-a adăugat ADP în diferite concentraţii. Nu s-au observat diferenţe de comportare remarcabile, curbele avînd acelaşi aspect, indiferent de natura nucleotidului adăugat.

DISCUŢII

Inhibiţia şi reactivarea spontană a oxidării succinatului, descrisă în aceste experienţe, apare numai în anumite condiţii, depinzînd de concentraţiile relative ale substratului, ale *2,4*-dinitrofenolului, ale ATP-ului, de prezenţa fluorurii, de cantitatea de proteină mitocondrială. Variaţia concentraţiei unuia din aceşti factori este suficientă pentru a face ca fenomenul să se atenueze sau să dispară. Se pare că există un echilibru labil între factorii care determină inhibiţia şi cei care determină activarea respiraţiei.

Slater [12] şi Williams [13] au obţinut inhibiţia oxidării succinatului numai în prezenţă de *2,4*-dinitrofenol, iar Chance şi Hagihara [5] numai în mitocondrii învechite şi care şi-au pierdut parţial controlul respirator. Pe de altă parte, unii autori [7], [8] constată reactivarea sistemelor inhibate la adăugarea de ATP. Aceste fapte pledează în favoarea ipotezei că prevenirea sau înlăturarea inhibiţiei oxidării succinatului necesită un anumit nivel al ATP-ului sau ai intermediarilor macroergici formaţi în

fosforilarea oxidativă [12]. În experienţele noastre am obţinut inhibiţia şi reactivarea spontană a oxidării succinatului, probabil prin echilibrarea foarte fină a reacţiilor de sinteză a ATP-ului şi a celor de descompunere.

Proprietăţii oxalacetatului de a inhiba oxidarea succinatului i s-a acordat un rol important în reglarea vitezei de oxidare a succinatului. Tyler [4] a studiat efectul intermediarilor ciclului acizilor tricarboxilici asupra utilizării oxalacetatului şi oxidării succinatului şi conchide că oxalacetatul este un regulator al vitezelor reacţiilor din ciclul acizilor tricarboxilici. Chance şi Hagihara [5] stabilesc o corelaţie între gradul de inhibiţie al oxidării succinatului şi nivelul de oxidare al $NADH_2$-ului. Ei consideră că reducerea piridin-nucleotizilor de către succinat ar avea rolul de a regla oxidarea malatului şi formarea oxalacetatului, prin menţinerea unui anumit nivel de oxido-reducţie al piridin-nucleotizilor.

CONCLUZII

Viteza respiraţiei mitocondriale cu succinat ca substrat prezintă inhibări şi reactivări repetate. Inhibiţia respiraţiei este datorită acumulării oxalacetatului în sistem; reactivarea este datorită îndepărtării oxalacetatului şi reîncepeerii oxidării succinatului. Aceste oscilaţii ale respiraţiei nu sînt observate decît în condiţii experimentale foarte stricte, ceea ce demonstrează existenţa unui echilibru foarte labil între factorii care determină inhibiţia şi cei care o înlătură.

Acest fenomen de periodicitate a vitezei oxidării succinatului pare a pune în evidenţă existenţa unui mecanism de control al vitezei respiraţiei mitocondriale prin oxalacetat, a cărui concentraţie este controlată la rîndul ei de concentraţia ATP-ului. Probabil că acest fenomen are importanţă fiziologică în reglarea vitezelor de reacţie în ciclul acizilor tricarboxilici.

Facultatea de medicină,
Bucureşti,
Laboratorul de biochimie I

Prezentată la redacţie la 12 iunie 1963

КОНТРОЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ СКОРОСТИ ОКИСЛЕНИЯ СУКЦИНАТА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали скорость дыхания митохондриев, пользуясь в качестве субстрата сукцинатом в присутствии 2,4 — динитрофенола (0,02 мМ). Было отмечено сильное торможение дыхания, когда окислению подверглась приблизительно половина количества находившегося в питательной среде сукцината. Эта система спонтанно выходит из состояния торможения и скорость дыхания иногда доходит до началь-

ных значений. Торможение и спонтанное реактивирование дыхания повторяются много раз, но все с меньшей амплитудой.

Торможение дыхания обусловливается накоплением оксалацетата в системе, так как: *а*) экзогенный оксалацетат обладает тем же действием, что и оксалацетат, образованный в митохондриях; *б*) добавление NAD в питательную среду ускоряет наступление торможения путем ускорения окисления малата в оксалацетат; *в*) удаление оксалацетата путем добавления глютамата 20 мМ + арсенита — I мМ устраняет или препятствует торможению. Малонат препятствует реактивированию заторможенных систем и это доказывает, что сукцинат является главным субстратом, который окисляется в периоде реактивирования.

Описанное явление — периодичность торможения и активирование окисления сукцината — иллюстрирует механизм регулирования скорости окисления сукцината в митохондриях и, по-видимому, имеет важность с физиологической точки зрения при регулировании скорости реакций в рамках цикла трикарбоксиловых кислот.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение скорости дыхания митохондриев в присутствии сукцината 30 мМ. Среда для инкубирования состоит из: буферного раствора фосфата калия; pH — 7,4 15 мМ; сернокислой магнезии — 6,7 мМ; цитохрома „c" — 0,02мМ; ЕДТА — I мМ; сахарозы — 0,1 М; КР 14 мМ; 2,4 – динитрофенола 0,02 мМ; аденозинтрифосфата 0,5 мМ; сукцината 30 мМ; 14 мг митохондриального протеина; конечный объем — 2 мл. Температура 25°С.

Рис. 2. — Изменение скорости дыхания митохондриев в зависимости от концентрации сукцината. Условия инкубирования как и на рис. 1. Концентрация сукцината: кривая + — — — + — — — + 10 мМ; кривая ▲ – . – ▲ – . – ▲ – . 20 мМ; кривая ● ——— ● ——— ● 30 мМ.

Рис. 3. — Скорость торможения дыхания митохондриев при помощи сукцината и при отсутствии NAD (слева), а также в присутствии I мМ NAD (справа). Условия инкубирования как и на рис. 1. Слева добавлено NAD 1 мМ. Концентрация сукцината + – – – + – – – + 10 мМ; кривая ▲ – . – ▲ – . – ▲ – . 20 мМ; кривая ● ——— ● ——— ● 30 мМ.

Рис. 4. — Эффект добавления глютамата + арсенита на дыхание митохондриев при наличии сукцината. Условия инкубирования как на рис. 1. Концентрация сукцината 30 мМ. Кривая ● ——— ● ——— ● без глютамата + арсенита; кривая ▲ – . – ▲ – . – ▲ – . – в присутствии глютамата 20 мМ с добавлением спустя 15 минут арсенита 1 мМ. Кривая + – – – + – – – + в присутствии глютамата 20 мМ и с добавлением спустя 30 минут арсенита 1 мМ.

Рис 5. — Эффект добавления малоната на дыхание митохондриев в присутствии сукцината. Условия инкубирования как на рис. 1. Концентрация сукцината — 30 мМ. Кривая ● ——— ● ——— ● без малоната; кривая + – – – + – – – + добавление 20 мМ малоната спустя 35 минут. Кривая ▲ – . – ▲ – . – ▲ – . добавление 20 мМ малоната спустя 40 мин. Кривая ■ ··· ■ ··· ■ добавление 20 мМ малоната спустя 45 мин.

Рис. 6. — Изменение скорости дыхания митохондриев в присутствии сукцината в зависимости от концентрации аденозинтрифосфата. Условия инкубирования — теже что и на рис. 1. Концентрация сукцината – 30 мМ. Кривая ● ——— ● ——— ● в присутствии АТФ — 0,5 мМ; кривая + – – – + – – – + – в присутствии АТФ 3,5мМ.

FACTEURS DE CONTRÔLE DE LA VITESSE D'OXYDATION DU SUCCINATE DANS LES MITOCHONDRIES DU FOIE DE RAT

RÉSUMÉ

On a étudié la vitesse de la respiration mitochondriale sur un substratum de succinate, en présence du 2,4-dinitrophénol (0,02 mM). On a observé une forte inhibition de la respiration lorsque environ la moitié de la quantité de succinate initialement présente dans le milieu a été oxydée. Le système sort spontanément de l'inhibition et alors la vitesse de la respiration atteint parfois les valeurs initiales. L'inhibition et la réactivation spontanée de la respiration reprennent plusieurs fois, mais à des amplitudes toujours moindres.

L'inhibition de la respiration est déterminée par l'accumulation de l'oxalacétate dans le système, car : *a*) l'oxalacétate exogène agit de la même manière que celui d'origine intra-mitochondriale ; *b*) l'addition de NAD dans le milieu hâte l'installation de l'inhibition, en accélérant l'oxydation du malate à oxalacétate ; *c*) l'élimination de l'oxalacétate par addition de glutamate 20 mM + arsénite 1 mM écarte ou empêche l'installation de l'inhibition. Le malonate empêche la réactivation des systèmes inhibés, ce qui démontre que le succinate est le principal substratum s'oxydant pendant la période de réactivation.

Le phénomène décrit — périodicité de l'inhibition et de l'activation de l'oxydation du succinate — illustre le mécanisme de réglage de la vitesse d'oxydation du succinate dans les mitochondries et a, probablement, une importance physiologique dans le réglage des vitesses de réaction du cycle des acides tricarboxyliques.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation de la vitesse de la respiration des mitochondries en présence de succinate 30 mM. Milieu d'incubation contenant : tampon phosphate de potassium, pH 7,4, 15 mM ; $MgSO_4$ 6,7 mM ; cytochrome c 0,02 mM ; EDTA 1 mM ; saccharose 0,1 M ; KF 14 mM ; 2,4-dinitrophénol 0,02 mM ; ATP 0,5 mM ; succinate 30 mM ; protéine mitochondriale 14 mg. Volume final 2 ml. Température 25°C.

Fig. 2. — Variation de la vitesse de la respiration des mitochondries en fonction de la concentration du succinate. Mêmes conditions d'incubation que dans la fig. 1.

Concentrations du succinate : la courbe +---------+------- -+ 10 mM ; la courbe ▲—.—▲—.—▲ 20 mM ; la courbe ●———●———● 30 mM.

Fig. 3. — Vitesses de l'inhibition de la respiration des mitochondries à succinate en absence de NAD (à gauche) et en présence de 1 mM NAD (à droite). Mêmes conditions d'incubation que dans la fig. 1. A gauche on a additionné 1 mM de NAD.

Concentrations du succinate : la courbe +---------+---------+10, mM ; la courbe ▲—.—▲—.—▲ 20 mM ; la courbe●———●———●30 mM.

Fig. 4. — Effet de l'addition de glutamate + arsénite sur la respiration des mitochondries à succinate. Conditions d'incubation comme dans la figure 1.

Concentration du succinate 30 mM. La courbe ●———●———● : sans addition de glutamate + arsénite ; la courbe ▲—.—▲—.—▲ : avec addition de glutamate 20

mM + arsénite 1 mM après 15 minutes; la courbe +---------+---------+ : avec glutamate 20 mM et arsénite 1 mM additionnés après 35 minutes.

Fig. 5. — Effet de l'addition de malonate sur la respiration des mitochondries à succinate. Mêmes conditions d'incubation que dans la fig. 1.

Concentration du succinate : 30 mM. La courbe ●———●———● : sans addition de malonate; la courbe +---------+---------+ : au malonate 20 mM additionné à 35 minutes; la courbe ▲—.—▲—.—▲ : au malonate 20 mM additionné à 40 minutes; la courbe—— : au malonate 20 mM additionné à 45 minutes.

Fig. 6. — Variation de la vitesse de respiration des mitochondries à succinate en fonction de la concentration de l'ATP. Mêmes conditions d'incubation que dans la fig. 1. Concentration du succinate : 30 mM. La courbe ●———●———● : à l'ATP 0,5 M; la courbe +---------+---------+ : à l'ATP 3,5 mM.

BIBLIOGRAFIE

1. B. CHANCE, C. R. WILLIAMS, Adv. Enzymol., **17**, 65 (1957).
2. N. B. DAS, Biochem. J., **31**, 1124 (1937).
3. B. CHANCE, G. HOLLUNGER, Fed. Proc., **16**, 703 (1957).
4. D. B. TYLER, Biochem. J., **76**, 293 (1960).
5. B. CHANCE, B. HAGIHARA, J. Biol. Chem., **237**, 3540 (1962).
6. T. P. SINGER, E. B. KEARNEY, P. BERNATH, J. Biol. Chem., **223** 599 (1956).
7. A. B. PARDEE, V. R. POTTER, J. Biol. Chem., **176**, 1085 (1948).
8. D. B. TYLER, J. Biol. Chem., **216**, 395 (1955).
9. G. F. AZZONE, L. ERNSTER, Nature, **187**, 65 (1960).
10. P. SCHOLLMEYER, M. KLINGENBERG, Biochem. Biophys. Res. Com., **4**, 43 (1961).
11. G. F. AZZONE, L. ERNSTER, J. Biol. Chem., **236**, 1518 (1961).
12. E. C. SLATER, W. C. HÜLLSMAN, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 1109 (1961).
13. G. R. WILLIAMS, Canad. J. Biochem. Physiol., **39**, 103 (1961).
14. B. CHANCE, B. HAGIHARA, *Al V-lea Congres de biochimie*, Moscova, 1961.
15. C. GÛRBAN, E. CRISTEA, St. cercet. biochimie, **4**, **4**, 551 (1961).
16. W. N. ALDRIDGE, Biochem. J., **67**, 423 (1957).

DATE EXPERIMENTALE PRIVIND REGLAREA ACTIVITĂȚII PROTEAZELOR PRIN FACTORI FIZIOLOGICI

DE

I. KIȚULESCU și V. BĂLUȚĂ

A devenit evident faptul că viața nu este posibilă în afara acțiunilor coordonate ale sistemelor enzimatice. Cele mai actuale probleme de creștere și diferențiere ale morfogenezei, ca de exemplu limitarea creșterii organelor, limitarea multiplicării celulare, menținerea diverselor structuri intracelulare, sînt probleme în care rolul controlului enzimatic își afirmă un interes teoretic și practic deosebit.

Fiziopatologia a fost nevoită să recurgă tot la aceste mecanisme de bază ale biochimiei pentru a înțelege condițiile care determină anumite deviații metabolice patogene. Creșterea tumorilor constituie în momentul de față obiectul celor mai multe cercetări care se centrează pe cunoașterea mecanismelor de control enzimatic.

Progresul în acest domeniu este dificil, datorită condițiilor complexe și variațiilor pe care le oferă materialul biologic (concentrația substratelor, pH, potențial redox etc.) și diferențelor care se acuză între starea biochimică *in vivo* și aceea *in vitro*. De aceea cercetările de acest gen cer combinarea unor modele complicate care pot oferi condiții cît mai apropiate de condițiile biologice respective, cu studiul relațiilor enzimatice directe care fac posibilă cunoașterea diverselor funcții biochimice prin cunoașterea structurii moleculelor care reacționează și a reacțiilor dintre aceste molecule.

Acțiunea hormonilor are o deosebită importanță pentru controlul activității enzimatice, datorită influenței puternice a acestora asupra metabolismului și rolului lor integrativ, însă deși observațiile privind acțiunea hormonilor asupra enzimelor sînt numeroase, demonstrarea relațiilor directe între hormoni și enzime este foarte rar întîlnită și neconcludentă.

În cercetările noastre ne-am preocupat în special de relația dintre mediatorii activității nervoase și activitatea unor enzime implicate în creșterea tumorală. Proteazele, în special cele active la pH 5, au o activitate crescută la periferia tumorii [1], [2] și pot servi ca punct de plecare observațiilor care sînt interesate în descifrarea mecanismelor de control metabolic al creșterii celulare și al lizocitogeniei [1-3].

În lucrări anterioare [3—5], am demonstrat că acetilcolina și acetilfosfatul activează încorporarea aminoacizilor marcați (glicina C^{14} și metionina S^{35}) în proteinele țesutului tumoral și netumoral, reușind prin acești factori activatori să diferențiem o tumoră cu creștere rapidă (omografa) de o tumoare în regres (eterografă) [5]. Studiul acestor factori activatori în condițiile amestecului sîngelui cu diversele organe a scos în evidență deosebirea între tumoare și țesuturi netumorale [6] și între sîngele de animal canceros și cel de animal necanceros [7].

În lucrarea de față am căutat să obținem precizări în privința mecanismului prin care acetilcolina activează proteazele și asupra diferențelor între proteazele active la pH 5 și cele active la pH 7,2.

Pentru a lărgi înțelegerea rolului mediatorilor chimici ai influxului nervos în mecanismul de control enzimatic, am studiat și acțiunea tiaminpirofosfatului, care se știe că este mediator al influxului nervos și este liberat la capătul nervului în timpul excitației [8]. Am utilizat în experiențe și histamina, care poate fi un factor de control „feedback" negativ.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele noastre au conținut trei grupe de cercetări:

I. Cercetarea comparativă a acțiunilor acetilcolinei, coenzimei A și acetilfosfatului asupra activității papainei.

II. Cercetarea comparativă a influenței factorilor activatori acetilcolina-coenzima A asupra tripsinei și papainei.

III. Rolul tiaminpirofosfatului și histaminei în reglarea activității proteazelor active la pH 5 (papaina) și a proteazelor active la pH 7,2 (tripsina).

S-a lucrat cu acetilfosfat sintetizat de dr. V. Niculescu în Institutul oncologic, coenzima A NBC, tripsină NBC × 2 cristalizată, tiaminpirofosfat NBC, piruvat de sodiu NBC, papaină DIFCO, clorură de acetilcolină Hoffmann-La Roche, substrat de hemoglobină denaturată și standardizată pentru dozarea proteazică, marca Serva.

Condițiile în care s-a lucrat au fost următoarele: pentru experiențele din grupa I s-a folosit coenzima A în concentrație de 0,02 mg/probă, acetilcolina în concentrație de 0,2 mg/probă, acetil-fosfatul în concentrație de 0,6 mg/probă, arsenul în concentrație de 25 mg/probă, papaină în concentrație de 2 mg/probă.

Timpul de hidroliză enzimatică: o oră la 37°C.

În experiențele din grupele II și III s-a folosit coenzima A în concentrație de 1 mg/probă, acetilcolina în concentrație de 10 mg/probă, tiaminpirofosfatul în concentrație de 6 mg/probă, piruvatul de sodiu în concentrație de 20 mg/probă, histamina în concentrație de 10 mg/probă, papaina în concentrație de 2 mg/probă, iar tripsina în concentrație de 2 mg/probă. Volumul final al amestecului de reacție: 4 ml. Timpul de hidroliză enzimatică: 30 min la 37°C.

În toate experienţele s-a folosit substratul de hemoglobină de vită standardizat şi în concentraţie de 2%; pH-urile au fost riguros corectate pentru toate probele, la 5,4 pentru activitatea papainei şi 7,2 pentru activitatea tripsinei , şi menţinute constante în timpul hidrolizei, prin tampon TRIS [tris (hidroximetil) aminometan].

Metoda de dozare utilizată a fost metoda Anson.

Rezultatele au fost exprimate în mg N tirozinic la 100 mg enzimă.

REZULTATE

Rezultatele sînt exprimate prin mediile lor, consemnate în cele două tabele din lucrare. Se constată următoarele :

Grupa I de experienţe demonstrează că papaina este influenţată direct şi activată accentuat de fiecare din următorii factori studiaţi :

Tabela 1

Activarea papainei prin coenzima A, acetilfosfat şi acetilcolină
(activitate exprimată în mg N tirozinic 100 mg papaină DIFCO)

Nr. exp.	Condiţiile de activitate	Activitate	Activarea papainei %
10	Papaina	30	—
10	Papaina + CoA	44	46
7	Papaina + ACTF	35	16
10	Papaina + ACH	40	33
7	Papaina + CoA + + ACTF	52	73
10	Papaina + CoA + + ACH	52	73

coenzima A, acetilcolina, acetilfosfatul. Adaosul coenzimei A împreună cu acetilcolina sau împreună cu acetilfosfatul în mediul în care acţionează papaina produce o activare mult mai accentuată a enzimei, reprezentînd aproape o însumare a acţiunilor separate ale coenzimei şi acetilcolinei sau coenzimei şi acetilfosfatului.

Tabela 2

Influenţa unor factori fiziologici asupra activităţii papainei şi tripsinei

Nr. exp.	Condiţiile de activitate	PAPAINĂ		TRIPSINĂ	
		Activitate mg N tirozinic % mg enzima	Influenţa	Activitate mg N tirozinic % mg enzima	Influenţa
10	Martor	26,6	—	76	—
10	CoA + ACH	81	+211%	76	0
7	Histamină	24	0	57,9	−23%
7	Histamină+CoA+ACH	81	0	46	−39%
10	Tiaminpirofosfat + piruvat	3,3	−87%	47,7	−38%
7	Piruvat	26	0	76	0
7	Tiaminpirofosfat	26	0	76	0

Arsenul adăugat în cercetare pentru proprietatea lui de a capta acetilul [9], în scopul precizării mecanismului prin care acești factori activează papaina, nu reușește să diminueze activarea produsă de coenzima A, acetilfosfat și acetilcolină asupra activității papainei.

Din rezultatele grupelor II și III de experiențe se constată următoarele:

Activarea produsă de acetilcolină și coenzima A asupra papainei este proporțională cu concentrația factorilor activatori, în limitele concentrațiilor folosite de noi. La concentrația de 1 mg CoA + 10 mg acetilcolină/probă se obține o activare medie de 200% a papainei. Tripsina nu suferă nici o influență în prezența acestor factori.

Histamina are o influență inhibitorie, în medie de 30% asupra activității tripsinei, și nu influențează activitatea papainei.

Tiaminpirofosfatul are o influență puternică asupra papainei și inversă celei produse de acetilcolină și coenzima A, inhibă aproape total activitatea papainei (inhibiția medie de 90%). Asupra tripsinei tiaminpirofosfatul produce de asemeni o influență marcată, tot inhibitorie, însă mai slabă decît asupra papainei, anume o inhibiție medie de 40%.

DISCUȚII

Condițiile de activare sau inactivare a unei enzime constituie de multă vreme un mijloc de studiu pentru mecanismul ei de acțiune.

Importanța acetilării pentru activitatea papainei reiese clar din rezultatele obținute.

Incapacitatea arsenului de a împiedica activarea papainei este o dovadă că în condițiile experiențelor noastre el este un competitor slab pentru acetil.

În experiențele noastre am folosit tiaminpirofosfatul nu numai pentru calitatea sa de mediator chimic al influxului nervos, dar și pentru faptul, demonstrat de un număr de cercetători [10], că această coenzimă este capabilă să catalizeze unele reacții caracteristice sistemelor enzimatice dependente de tiaminpirofosfat, în absența vreunuia din aceste sisteme enzimatice. Astfel α-cetoacizii sînt decarboxilați, cu formarea aldehidei corespunzătoare sau α-cetoalcoolului corespunzător, numai în prezența tiaminpirofosfatului. Acest proces stă la baza acțiunii prin care tiaminpirofosfatul produce inhibiție asupra papainei și tripsinei, deoarece utilizarea în mediul de reacție numai a tiaminpirofosfatului și a proteazei respective, fără piruvat, nu produce nici o influență asupra activității proteazice. De asemenea piruvatul singur, fără tiaminpirofosfat, nu influențează activitatea proteazelor. Numai adaosul tiaminpirofosfatului împreună cu piruvatul realizează acțiunea inhibitorie puternică asupra activității proteazice, constatată de noi.

Faptul că excitația nervoasă are posibilitatea să regleze activitatea proteazică a celulelor de la capătul terminației nervoase, fie activînd fie

inhibînd aceste activităţi enzimatice, poate avea implicaţii importante fiziologice şi poate servi studiilor unor deviaţii metabolice realizate printr-o îndelungată şi permanentă excitaţie locală.

Diferenţele obţinute prin aceşti factori între comportarea papainei şi tripsinei accentuează importanţa cunoaşterii semnificaţiei fiziologice a fiecărei proteaze în parte.

Institutul oncologic, Bucureşti,
Laboratorul de enzimologie

Prezentată la redacţie la 11 mai 1963

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО ВОПРОСУ РЕГУЛИРОВАНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПРОТЕАЗ ПРИ ПОМОЩИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали деятельность папаина при pH = 5,4 и трипсина при pH = 7,2 в присутствии ацетилхолина, тиаминпирофосфата и гистамина.

Ацетилхолин выраженно усиливает деятельность папаина. Такое же активирование получается при действии коэнзима А и ацетилфосфата.

Мышьяк не препятствует этому активированию.

Активирование пропорционально концентрации активирующих факторов. Смесь, состоящая из I мг коэнзима А и 10 мг ацетилхолина, усиливает в среднем на 200% гидролиз субстрата, вызываемый 2 мг папаина в течение 30 минут.

Ацетилхолин, коэнзим А и ацетилфосфат не оказывают сильного действия на активирование трипсина при pH = 7,2.

Тиаминпирофосфат в присутствии пирувата сильно влияет на деятельность папаина в направлении противоположном действию ацетилхолина, вызывая почти полное торможение деятельности этого энзима. Тиаминпирофосфат оказывает влияние также и на трипсин, но торможение трипсина является более слабым, чем торможение папаина.

В отсутствии пирувата тиаминпирофосфат не обладает этим действием.

Гистамин в экспериментальных условиях влияет только на деятельность трипсина путем менее слабого торможения, чем торможение, вызываемое тиаминпирофосфатом.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES CONCERNANT LE RÉGLAGE DE L'ACTIVITÉ DES PROTÉASES PAR DES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES

RÉSUMÉ

On a étudié l'activité de la papaïne au pH 5,4 et de la trypsine au pH 7,2 en présence de l'acétylcholine, du thiamine-pyrophosphate et de l'histamine.

L'acétylcholine accentue considérablement l'activité de la papaïne. Des activations semblables sont obtenus par la coenzyme A et par l'acétylphosphate. Cette activation n'est pas empêchée par l'arsenic.

L'activation est proportionnelle à la concentration des facteurs activants. Le mélange de 1 mg coenzyme A et 10 mg acétylcholine fait accroître en moyenne de 200% l'hydrolyse du substratum produite par l'action de 2 mg papaïne en 30 minutes.

L'acétylcholine, la coenzyme A et l'acétylphosphate n'influent pas d'une manière significative sur l'activité de la trypsine au pH 7,2.

Le thiamine-pyrophosphate en présence de pyruvate influe fortement sur l'activité de la papaïne dans un sens opposé à l'action de l'acétylcholine, en produisant une inhibition presque totale de l'activité de cette enzyme. L'influence du thiamine-pyrophosphate s'exerce aussi sur la trypsine, mais l'inhibition déterminée sur cette enzyme est plus faible que chez la papaïne. Dans l'absence du pyruvate, le thiamine-pyrophosphate ne produit pas ces actions.

L'histamine dans les conditions de ces expériences n'influe que sur l'activité de la trypsine, en déterminant une inhibition moindre que celle provoquée par le thiamine-pyrophosphate.

BIBLIOGRAFIE

1. B. SYLVEN, H. MALMGREN, Acta radiol. (Stockholm), suppl., 154 (1957).
2. G. BENZ, Oncologia, **12**, 128 (1959).
3. I. KITULESCU, V. BĂLUTĂ, St. cercet. biochimie, *2*, 229 (1962).
4. O. COSTĂCHEL, I. KITULESCU, N. VOICULET, Acta biol. med. germanica, **3**, 187 (1960).
5. O. COSTĂCHEL, I. KITULESCU, N. VOICULET, I. POPP, Acta biol. med. germanica, **3**, 197 (1960).
6. I. KITULESCU, V. BĂLUTĂ, Oncologia şi Radiologia, *1*, 53 (1963).
7. I. KITULESCU, V. BĂLUTĂ, Oncologia şi Radiologia, 1964 (sub tipar).
8. A. VON MURALT, Ann. N. Y. Acad. Sci. **98**, 499 (1962).
9. E. R. STADTMAN, în *Methods in enzymology*, vol. I, sub redacţia *S. Colowech şi N. O. Kaplan*, Academie Press, New York, 1955, p. 596.
10. S. MIZUHARA, P. HANDLER, J. Am. Chem. Soc., **76**, 571 (1954).

CERCETĂRI COMPARATIVE ASUPRA UNOR METODE PENTRU DETERMINAREA ACTIVITĂȚII XANTINOXIDAZICE A FICATULUI

DE

A. POPESCU-ȘTEFĂNESCU, C. BĂLAN și M. D. MEZINCESCU

În timpul din urmă s-au elaborat o serie de metode pentru determinarea activității dehidrogenazelor, bazate pe reducerea sărurilor de trifeniltetrazoliu și a compușilor înrudiți. Metodele de acest fel sînt mai avantajoase decît cele clasice, bazate pe decolorarea albastrului de metilen, ale căror neajunsuri sînt binecunoscute: este greu să se stabilească precis cînd s-a desăvîrșit decolorarea; pe de altă parte, activitățile enzimatice sînt măsurate prin timpurile de decolorare, așa încît asimilarea lor cu concentrațiile enzimelor este discutabilă.

Tehnica modernă pentru determinarea activității xantinoxidazice cu albastru de metilen este cea pusă la punct de Figge și Strong [1]. Astăzi se tinde însă la înlocuirea ei cu o metodă bazată pe reducerea clorurii de trifeniltetrazoliu, elaborată de Villela [2].

Diverse probleme privind activitatea xantinoxidazică au fost studiate, aproape simultan, de unii cercetători cu ajutorul primei metode, iar de alții cu cea de a doua. Și noi am folosit ambele metode, pentru cercetarea unor probleme strîns legate între ele. Pentru ca să putem compara rezultatele obținute în lucrările de acest fel — efectuate fie cu una, fie cu cealaltă dintre metode — a fost necesar să comparăm metodele înseși; cu alte cuvinte, să urmărim sistematic corespondența dintre activitățile enzimatice la care ele conduc.

Prezentăm aici rezultatele pe care le-am obținut. Ele permit să se exprime activitățile enzimatice stabilite printr-una din cele două metode în unitățile specifice pentru cealaltă. Aceste rezultate constituie totodată o verificare utilă a metodei lui Villela; într-adevăr, acesta n-a comparat metoda sa cu nici una din metodele anterioare.

Menționăm că metoda Figge-Strong a fost comparată și cu metoda manometrică Axelrod-Elvehjem [3], de către Richert, Edwards și Wester-

feld [4], în 1949. Prin urmare, împreună cu lucrarea acestor autori, lucrarea de faţă îngăduie să se transforme în date omogene rezultatele obţinute prin toate cele trei metode folosite astăzi cel mai des pentru determinarea activităţii xantinoxidazice: manometrică, Figge-Strong şi Villela.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

1. *Animale şi raţii.* Determinările activităţii xantinoxidazice au fost făcute pe ficat de şobolan. Cum era de dorit ca concentraţiile enzimei să fie distribuite într-un domeniu cît mai întins, s-au folosit şobolani cu vîrste de la 2 la 14 luni; pe de altă parte, în perioade variabile precedînd data sacrificării (de 5, 7 sau 10 zile), animalele au fost hrănite *ad libitum* cu una dintre următoarele 3 raţii: „obişnuită", cu 6% cazeină sau cu 25% cazeină. S-a procedat astfel deoarece se ştie că activitatea xantinoxidazică a ficatului variază atît în raport cu vîrsta animalului, cît şi cu conţinutul în proteine al raţiei.

Raţiile au avut compoziţiile următoare:

Raţia obişnuită era constituită din pîine, boabe de porumb (sau de ovăz), lapte şi morcovi. *Raţia cu 6% cazeină* cuprindea: glucoză 74; untură de porc 10; cazeină 6; raţie de bază 10. *Raţia cu 25% cazeină* cuprindea: glucoză 55; untură de porc 10; cazeină 25; raţie de bază 10. *Raţia de bază* cuprindea: amidon 100 g; agar 300 g; ulei comestibil 300 g; amestec salin[1]) 300 g; molibdat de sodiu 50 mg şi amestec de vitamine[2]). *Cazeina* cuprinsă în raţii era suplementată cu 3% metionină şi 10% drojdie uscată.

2. *Prepararea omogenatelor.* Determinările paralele de activitate xantinoxidazică (prin metoda Villela şi metoda Figge-Strong) au fost făcute, în genere, pe omogenatul obţinut din ficatul întreg al unui şobolan[3]). S-a procedat în felul următor: animalul a fost sacrificat prin decapitare şi i s-a prelevat imediat ficatul; acesta a fost şters de sînge cu hîrtie de filtru, a fost cîntărit şi apoi omogeneizat timp de 3 minute în aparatul Nelco, cu o cantitate dublă de apă rece (la 4—5°). S-a obţinut astfel un omogenat în care ficatul era diluat în proporţia 1 : 2. Înainte de a fi întrebuinţat, omogenatul a fost filtrat prin 3 straturi de tifon.

3. *Metoda Villela.* La o probă de 3—4 g omogenat s-a adăugat o cantitate egală de apă, obţinîndu-se o diluţie care cuprindea 16,7 g ficat în 100 ml. 5 ml din această diluţie s-au trecut într-un flacon Erlenmeyer de 50 ml. Flaconul a fost agitat apoi într-o baie de apă, la 37°, timp de 40 de minute, pentru epuizarea respiraţiei endogene. După trecerea acestui interval, s-au introdus cîte 0,5 ml omogenat în 5 tuburi Thunberg care cuprindeau fiecare cîte 2 ml soluţie tampon de pirofosfat 0,033 M (cu pH 8,6). În anexele tuburilor s-au introdus cîte 0,3 ml soluţie 0,1 % de clorură de trifeniltetrazoliu, iar în 3 dintre anexe s-a mai adăugat şi cîte 0,1 ml soluţie 0,05 M de xantină (în soluţie 0,05 M de hidroxid de sodiu). În celelalte două anexe (ale probelor martor) s-a introdus, în locul soluţiei de xantină,

---

[1]) După Terroine şi Reichert [5], conţinînd: Nacl 11,6; KCl 10,4; HK_2PO_4 23,2; $HNaCO_3$ 2,9; K_2SO_4 1,8; citrat de magneziu $[Mg_3(C_3H_5O_7)_2.14H_2O]$ 9,4; citrat de calciu $[Ca_3(C_6H_5O_7)_2.2H_2O]$ 34,8; şi citrat de fier $[FeC_6H_5O_7.3H_2O]$ 5,8 părţi pentru 100.

[2]) Clorhidrat de tiamină 12 mg, riboflavină 20 mg, piridoxină 12 mg, nicotinamidă 25 mg, biotină 2 mg, inozitol 250 mg, acid folic 3 mg, acid *p*-aminobenzoic 300 mg, pantotenat de Ca 50 mg, clorhidrat de colină 2500 mg, vitamină A 100 000 U. I., vitamină D_3 20 000 U. I., vitamină K 2,5 mg şi vitamină E 22 mg, pentru 1 kg raţie de bază.

[3]) La animalele de circa 2 luni ficatul era însă prea mic; de aceea s-a folosit pentru analize omogenatul obţinut din ficaţii proveniţi de la 2 animale de aceeaşi vîrstă şi care au fost supuse la acelaşi regim.

cîte 0,1 ml apă. Tuburile au fost evacuate de aer și echilibrate în baia de apă, la 37°, timp de 10 minute. După acest interval, conținutul anexelor a fost răsturnat în tuburi și amestecurile au fost incubate timp de 30 de minute la 37°. S-au adăugat apoi în fiecare tub cîte 7,5 ml acid acetic glacial și cîte 4 ml toluen. Amestecurile au fost agitate puternic, iar toluenul, care cuprindea formazanul rezultat în urma reacției enzimatice, a fost separat prin centrifugare. Cantitatea de formazan a fost dozată spectrofotometric la $\lambda = 480$ mμ, folosindu-se o curbă de etalonare. (În regiunea de concentrații ce ne interesa, relația dintre extincție și concentrația formazanului era de altfel perfect liniară).

Activitățile xantinoxidazice au fost exprimate în unitățile folosite de Villela (Uv). O unitate corespunde cantității de enzimă care, în condițiile încercărilor [2], la 37° și în 30 de minute, catalizează producerea de 1 μg formazan.

4. *Metoda Figge-Strong.* 12 ml din omogenatul primar (cuprinzînd 4 g ficat în 8 ml apă) s-au dializat timp de 4 ore față de apă curentă și apoi timp de 19 ore față de apă distilată, la răcitor. Dializatul s-a trecut cantitativ într-un cilindru gradat și a fost diluat la 16 ml cu apă distilată. Din acest omogenat, care cuprindea 25 g ficat în 100 ml, s-au introdus cîte 2 ml în 5 tuburi Thunberg. S-au adăugat apoi, în fiecare tub, cîte 0,2 ml soluție tampon de fosfați 0,5 M, cu pH 7,2. În anexele primelor 3 tuburi s-a introdus cîte 0,1 ml soluție 0,0113 M albastru de metilen și cîte 0,2 ml soluție 0,5% hipoxantină (în soluție 0,05 M de hidroxid de sodiu). În anexa tubului al 4-lea (proba martor) s-a introdus 0,1 ml din soluția de albastru de metilen și 0,2 ml apă distilată, în locul soluției de hipoxantină. În al 5-lea tub (tubul de comparație) s-au introdus, direct peste omogenat și soluția tampon, 0,2 ml din soluția de hipoxantină și 0,1 ml soluție 0,00113 M albastru de metilen (1/10 din cantitatea de colorant introdusă în celelalte tuburi). Primele 4 tuburi au fost evacuate de aer și echilibrate în baia de apă, la 37°, timp de 5 minute. S-a răsturnat apoi conținutul anexelor în tuburi, iar acestea au fost păstrate mai departe în baie și s-a urmărit în timp decolorarea albastrului de metilen. S-a socotit drept măsură a activității enzimatice timpul necesar pentru 90% decolorare, apreciată cu ajutorul tubului de comparație. Timpurile de decolorare (T_D) s-au exprimat în secunde.

REZULTATE

Rezultatele determinărilor făcute paralel, prin ambele metode, sînt consemnate în tabela 1. În tabelă se mai arată vîrstele șobolanilor și rațiile cu care au fost hrăniți. Pentru ca să se poată vedea imediat dacă între cele două serii de rezultate există o corespondență regulată, s-au înscris într-un grafic (fig. 1) perechile de valori aflate pentru diversele probe.

DISCUȚIE

Din tabela 1 reiese că animalele pe care le-am cercetat prezentau activități xantinoxidazice foarte variate; spre exemplu, unor animale le corespund timpuri de decolorare în raportul de 1 la 8; de altfel prin metoda Figge-Strong nici nu se pot determina corect activități cuprinse într-un interval mai întins. Pe de altă parte, determinările sînt deajuns de numeroase (au privit 62 de probe) și fiecare a fost făcută în dublu,

cu rezultate foarte apropiate. De aceea datele pe care le-am stabilit permit să se compare cele două metode în condiții mulțumitoare.

În principiu, valorile numerice la care conduce metoda Villela (notate cu U_V) sînt proporționale cu concentrațiile enzimei în probe. În schimb,

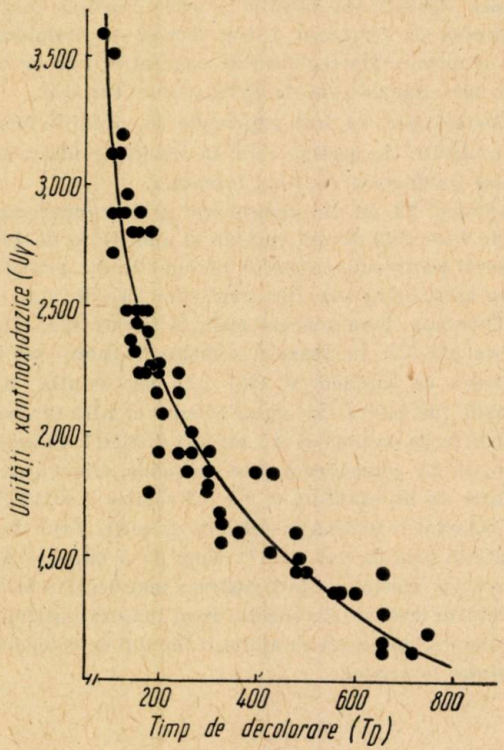


Fig. 1. — Activitățile xantinoxidazice aflate în determinări paralele, prin metoda Villela și metoda Figge-Strong, în probe de ficat.

timpurile de decolorare (T_D) sînt *quasi*-proporționale cu reciprocele concentrațiilor. Așadar putem scrie :

$$U_V = k_1 [E] \quad \text{și} \quad T_D = \frac{k_2}{[E]} ;$$

iar din aceste expresii rezultă :

$$U_V \times T_D = \text{constant}$$

Prin umare, linia corespunzătoare punctelor cu coordonatele U_V și T_D ar trebui să aibă înfățișarea unui arc de hiperbolă. De fapt, punctele pentru diversele probe pe care le-am cercetat, din figura 1, sînt cuprinse înr-o zonă îngustă al cărei ax este o linie hiperbolică. Această concordanță dovedește nemijlocit că ambele metode sînt perfect valabile, chiar dacă sînt susceptibile de unele erori.

Tabela 1

Activităţile xantinoxidazice obţinute, în paralel, prin metoda Villela şi metoda Figge-Strong

Animal nr.	Vîrsta (luni)	Raţia administrată	Durata administrării raţiei (zile)	Activitate xantinoxidazică	
				Unităţi Villela*)	Timp de decolorare**) (secunde)
1	2	obişnuită	—	1,920	200
2	„	id.	—	2,800	180
3	„	id.	—	3,120	120
4	„	id.	—	3,120	110
5	„	id.	—	2,960	135
6	„	cu 6% cazeină	5	1,360	600
7	„	id.	„	1,280	660
8	„	id.	„	1,440	480
9	„	cu 25% cazeină	„	1,680	325
10	„	id.	„	1,600	360
11	„	id.	„	2,320	150
12	„	cu 6% cazeină	7	1,160	658
13	„	id.	„	1,120	660
14	„	id.	10	1,440	660
15	„	id.	„	1,120	660
16	„	cu 25% cazeină	„	2,360	143
17	„	id.	„	1,760	180
18	2½	cu 6% cazeină	7	1,360	563
19	„	id.	„	1,440	497
20	„	id.	„	1,488	485
21	„	id.	„	1,520	423
22	„	id.	„	2,880	167
23	„	id.	10	1,200	750
24	„	id.	„	2,240	167
25	4	obişnuită	—	2,240	197
26	„	id.	—	3,200	125
27	9	cu 6% cazeină	7	1,920	265
28	„	id.	„	1,840	300
29	„	id.	„	1,792	297
30	„	id.	„	1,760	300
31	10	cu 6% cazeină	5	1,840	430
32	„	id.	„	2,160	195
33	„	id.	„	2,400	180
34	„	id.	„	2,240	240
35	„	cu 25% cazeină	„	2,880	120
36	„	id.	„	2,240	165
37	„	id.	„	2,480	137
38	„	id.	„	2,800	155
39	„	cu 6% cazeină	7	1,600	480
40	„	id.	„	1,840	398
41	„	id.	„	1,920	300
42	„	cu 25% cazeină	„	2,880	130
43	„	id.	„	2,480	168
44	„	id.	„	2,880	110
45	„	cu 6% cazeină	10	1,120	720
46	„	id.	„	1,360	570
47	„	u 25% cazeină	„	2,800	150
48	„	id.	„	1,920	240
49	„	id.	„	2,000	263
50	12	obişnuită	—	2,480	173

Tabela 1 (continuare)

Animal nr.	Vîrsta (luni)	Raţia administrată	Durata administrării raţiei (zile)	Activitate xantinoxidazică	
				Unităţi Villela*)	Timp de decolorare**) (secunde)
51	„	obişnuită	—	2,480	160
52	„	id.	—	2,272	200
53	„	id.	—	3,600	88
54	„	id.	—	2,720	102
55	„	id.	—	3,520	105
56	„	id.	—	1,560	328
57	„	cu 6% cazeină	7	1,840	256
58	„	id.	„	2,080	207
59	„	cu 6% cazeină	10		
		obişnuită	7	2,432	155
60	„	cu 6 % cazeină	10		
		obişnuită	7	2,272	182
61	14	cu 6% cazeină	7	1,640	328
62	„	id.	„	2,160	240

*) $\frac{\mu g \text{ formazan produs în 30 de minute}}{mg \text{ ţesut uscat}}$

**) intervalul necesar pentru reducerea a 1,02 μmoli albastru de metilen la leucoderivat.

Constatarea noastră este cu atît mai utilă cu cît Richert şi colab. [4] au pus la îndoială valoarea metodei Figge-Strong. Într-adevăr, comparînd-o cu metoda manometrică Axelrod-Elvehjem, ei au stabilit că pentru activităţile relativ mari (pentru care se obţin timpuri de decolorare mai mici decît 5 minute) *„între cele două metode există o relaţie lineară"*; însă *„cu nivele mai mici ale activităţii enzimatice timpul de decolorare era prelungit în mod progresiv"*. Această concluzie nu este însă justificată. Într-adevăr, autorii pleacă probabil de la premisele : 1) că metoda manometrică conduce la rezultate corecte, şi 2) că între activităţile obţinute prin această metodă şi timpurile de decolorare trebuie să existe o relaţie lineară de felul : $y = -ax + b$, unde y este consumul de oxigen şi x este timpul de decolorare. Ambele premise sînt însă inexacte : *în primul rînd*, chiar Richert şi colab. au arătat, în acelaşi memoriu, că pentru activităţi mici metoda manometrică dă rezultate aberante ; *pe de altă parte*, prin metoda manometrică se măsoară în principiu concentraţia enzimei, aşa încît consumul de oxigen şi timpul de decolorare trebuie să fie *invers* proporţionale, nu proporţionale (cu alte cuvinte, relaţia dintre ele trebuie să fie de forma : xy = constant). De fapt, împreună cu constatările noastre, care dovedesc că metoda Figge-Strong permite să se evalueze corect chiar şi activităţile mici, datele comparative stabilite de Richert şi colab. arată că metoda manometrică este cea deficitară, deşi uneori mai este socotită drept metodă standard.

★

După cum am spus mai înainte, scopul principal pe care l-am urmărit a fost să putem compara cantitativ rezultatele obţinute prin metoda

Figge-Strong cu cele obținute prin metoda Villela, în diverse cercetări. Această comparație nu se poate face în mod acceptabil decît exprimîndu-se toate rezultatele fie în timpuri de decolorare, fie în unități Villela. Cum rezultatele sînt afectate de erori, iar relația dintre cele două feluri de valori este o relație statistică, o transpunere corectă (și totodată comodă) presupunea folosirea unei ecuații stabilite prin metoda celor mai mici pătrate.

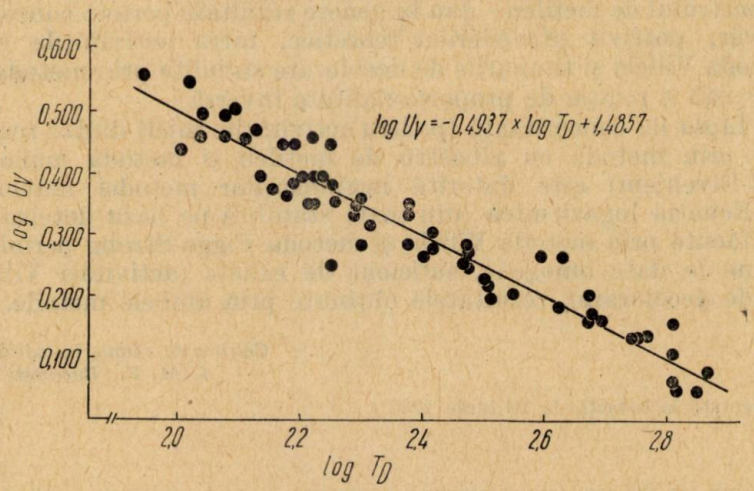


Fig. 2. — Relația dintre valorile obținute prin metoda Villela (U_V) și cele obținute prin metoda Figge-Strong (T_D) în determinările paralele de activitate xantinoxidazică.

Pentru ca să putem obține această ecuație, am înscris într-un grafic, pentru fiecare probă, logaritmul rezultatului obținut prin metoda Figge-Strong (în abscise) și logaritmul rezultatului obținut prin metoda Villela (în ordonate). Graficul este redat în figura 2. Am stabilit apoi, prin metoda obișnuită, linia de regresie corespunzînd tuturor punctelor. Ea are ecuația următoare :

$$\leftarrow \log U_V = -0{,}4937 \times \log T_D + 1{,}4857,$$

unde U_V este activitatea enzimatică exprimată în unități Villela, iar T_D este timpul de decolorare obținut prin metoda Figge-Strong.

Cu ajutorul acestei ecuații se pot obține imediat timpurile de decolorare corespunzînd activităților exprimate în unități Villela; de asemenea, se pot exprima în aceste unități activitățile determinate prin metoda Figge-Strong. Valorile la care conduce ecuația sînt perfect legitime și nu pot să comporte, în genere, decît erori neglijabile; într-adevăr, coeficientul de corelație dintre cele două serii de rezultate (din care am dedus ecuația) este deosebit de mare : are valoarea — 0,9574. De fapt, dacă plecăm de la timpurile de decolorare menționate în tabelă și calculăm cu ajutorul ecuației activitățile Villela, obținem în puține cazuri rezultate care diferă de cele experimentale cu mai mult de 10%.

CONCLUZII

Din datele şi discuţia de mai sus se pot trage următoarele concluzii :

1. Cele două metode pentru determinarea activităţii xantinoxidazice pe care le-am cercetat — metoda Villela, bazată pe reducerea clorurii de trifeniltetrazoliu, şi metoda Figge-Strong, bazată pe decolorarea albastrului de metilen — dau în genere rezultate perfect concordante : într-adevăr, potrivit prevederilor teoretice, între activităţile obţinute prin metoda Villela şi timpurile de decolorare stabilite prin metoda Figge-Strong există o relaţie de proporţionalitate inversă.

2. Lipsa de concordanţă (pentru activităţile mici) dintre rezultatele obţinute prin metoda cu albastru de metilen şi metoda manometrică (Axelrod-Elvehjem) este datorită neajunsurilor metodei manometrice.

3. Ecuaţia logaritmică (din text) stabilită pe baza determinărilor paralele făcute prin metoda Villela şi metoda Figge-Strong permite să se transforme în date omogene, suficient de exacte (activităţi Villela sau timpuri de decolorare), rezultatele obţinute prin ambele metode.

Catedra de chimie biologică I,
I. M. F., Bucureşti

Prezentată la redacţie la 20 iunie 1963

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КСАНТИНОКСИДАЗЫ ПЕЧЕНИ

РЕЗЮМЕ

Для сравнения методов определения деятельности ксантиноксидазы, предложенных Виллелой (основанных на восстановлении хлористого трифенилтетразола), а также методов, предложенных Фигге и Стронгом, основанных на обесцвечивании метиленовой синьки, авторы, пользуясь обоими этими методами, производили определения печеночной ксантиноксидазы у 62 крыс с деятельностью этого энзима, осуществляемой в весьма широких рамках.

Оказалось, что упомянутые методы дают совершенно совпадающие результаты, так как деятельность, установленная при помощи метода Виллелы, обратно пропорциональна продолжительности периода обесцвечивания, согласно теоретическим вычислениям.

Среди показателей деятельности, полученных при помощи метода Виллелы (U_V), и периодами обесцвечивания — по методу Фигге-Стронга (T_D) существует соотношение

$$\text{лог } U_V = -0{,}4937 \times \text{лог } T_D + 1{,}4857.$$

Эта формула позволяет превратить в одинаковые, достаточно точные показатели (деятельности — по Виллеле, или же периоды обесцвечивания) данные, полученные при помощи методов.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Показатели деятельности ксантиноксидазы, установленные путем параллельных определений по методу Виллелы и по методу Фигге-Стронга в пробах печени.

Рис. 2. — Отношения между значениями, полученными по методу Виллелы (U_V) и по методу Фигге-Стронга (T_D) при параллельных определениях деятельности ксантиноксидазы.

RECHERCHES COMPARATIVES SUR DEUX MÉTHODES POUR LA DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ XANTHINOXYDASIQUE DU FOIE

RÉSUMÉ

Afin de comparer la méthode pour la détermination de l'activité xanthinoxydasique proposée par Villela (basée sur la réduction du chlorure de triphényltétrazolium) avec celle de Figge et Strong (basée sur la décoloration du bleu de méthylène), on a déterminé à l'aide des deux méthodes la xanthinoxydase hépatique chez 62 rats. L'activité de l'enzyme était distribuée dans un très large domaine.

On a pu constater ainsi que ces méthodes donnent des résultats parfaitement concordants, les activités obtenues par la méthode de Villela étant généralement inversement proportionnelles aux temps de décoloration, conformément aux prévisions théoriques.

Entre les activités obtenues par la méthode de Villela (U_V) et les temps de décoloration obtenus par la méthode de Figge-Strong (T_D) il existe la relation suivante :

$$\log U_V = -0{,}4937 \times \log T_D + 1{,}4857,$$

qui permet de transformer en données homogènes (activités Villela ou temps de décoloration) les résultats obtenus par ces deux méthodes.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Activités xanthinoxydasiques trouvées par des déterminations parallèles selon Villela et selon Figge-Strong dans les spécimens de foie.

Fig. 2. — Relation entre les valeurs obtenues par la méthode de Villela (U_V) et celles obtenues par la méthode de Figge-Strong (T_D) dans des déterminations parallèles de l'activité xanthinoxydasique.

BIBLIOGRAFIE

1. FIGGE F. H. J., STRONG L. C., Cancer Res., **1**, 779 (1941).
2. VILLELA G. G., Rev. brasil. Biol., **14**, 455 (1954).
3. AXELROD A. E., ELVEHJEM C. A., J. Biol. Chem., **140**, 725 (1941).
4. RICHERT A. D., EDWARDS S., WESTERFELD W. W., J. Biol. Chem., **181** 255 (1949).
5. TERROINE E. F., REICHERT T., Arch. int. Physiol., **32**, 337 (1930).

DATE PRELIMINARII ASUPRA UNUI NOU PRODUS DE METABOLISM *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*[1])

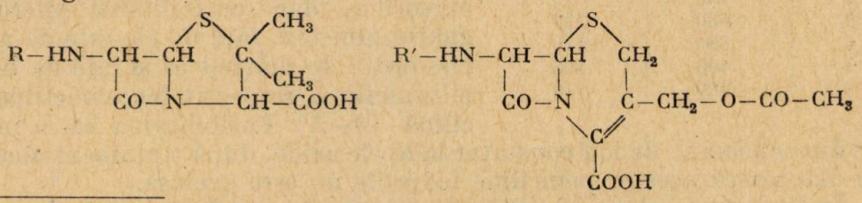
DE

AL. SAUCIUC

La folosirea industrială a unei tulpini de *Penicillium chrysogenum* cu productivitate ridicată (tulpina 194), s-au constatat unele anomalii în fazele de purificare. O cauză a acestor anomalii — prezența penicilinelor străine — a fost discutată într-o lucrare anterioară [2]). Altă cauză a randamentului scăzut, în special la operația de extracție a penicilinei din lichidele de fermentație, este prezența în acestea a unor substanțe care după tratament alcalin au proprietăți reducătoare, falsificînd rezultatul dozării iodometrice a penicilinei. Prezența lor este semnalată de literatură [1] [2] și se manifestă în special prin diferența între dozările microbiologice și cele iodometrice (ultimele dau rezultate mai mari) și prin faptul că nu se extrag în solvenții organici uzuali.

În această lucrare, pe baza rezultatelor experimentale și a datelor din literatură, se discută structura posibilă a acestor substanțe.

Examinarea lichidelor de fermentație epuizate prin extracția acidă, așa-numitele „ape acide", cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie, folosind tehnica indicată în lucrarea anterioară [2]), arată prezența la start a unei peniciline hidrofile și, numai uneori, prezența benzilpenicilinei (II) sau fenoximetilpenicilinei (III). Aceste zone sînt deosebit de mici în raport cu cantitatea de antibiotic (dedusă din dozarea iodometrică) aplicată pe cromatogramă.



[1]) Probele biologice au fost efectuate de M. RUSAN.

[2]) AL. SAUCIUC, M. BUDĂI, M. RUSAN, R. BOSTAN, în manuscris.

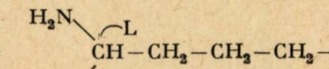
I R = H : acid 6-aminopenicilanic

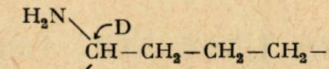
II R = $C_6H_5CH_2CO$: benzilpenicilină

III R = $C_3H_5OCH_2CO$: fenoximetilpenicilină

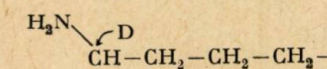
IV R = $HOC_6H_4CH_2CO$: *p*-hidroxibenzilpenicilină

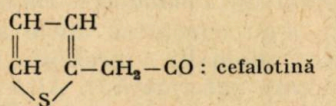
V R = $HOC_6H_4OCH_2CO$: *p*-hidroxifenoximetilpenicilină

VI R =  : izopenicilină N

VII R =  : penicilină N

VIII R′ = H : acid 7-aminocefalosporanic

IX R′ =  : cefalosporină C

X R′ =  : cefalotină

Dozarea paralelă a conținutului de penicilină prin metoda iodometrică (cu hidroliza alcalină) și prin metoda difuzimetrică în agar cu cilindri (microorganism test *Staphylococcus aureus* 209 P) indică o activitate antibiotică foarte scăzută. În tabela 1 se prezintă aceste date, probele 1—3 fiind ape acide de la benzil-penicilină, iar probele 4—6 ape acide de la fenoximetilpenicilină.

Tabela 1

Rezultatul dozării iodometrice și microbiologice a unor ape acide. La probele 1—3 rezultatul s-a exprimat în benzilpenicilină, la probele 4—6 în fenoximetilpenicilină

Nr. probei	Activitate determinată u/ml	
	Iodometric	Microbiologic
1	740	31
2	700	<10
3	630	120
4	880	<10
5	400	108
6	980	<10

Această activitate antimicrobiană scăzută, remarcată și din zonele de inhibiție mici obținute la cromatograme, exclude posibilitatea ca aceste substanțe să fie *p*-hidroxibenzilpenicilină (IV) sau *p*-hidroxifenoximetilpenicilină (V). Aceste peniciline hidrofile s-ar putea forma în urma oxidării biologice a precursorilor, dar sensibilitatea microorganismului test față de ele este de același ordin de mărime ca și față de benzilpenicilină, respectiv fenoximetilpenicilină [3—5]. Posibilitatea ca o mică parte din consumul de iod constatat la apele acide, după tratament alcalin să se datorească acestor peniciline hidrofile nu este exclusă.

În literatura relativ recentă [6—9] este descris faptul că în fermentațiile de penicilină fără precursor se formează cantități mari de acid

6-aminopenicilanic (I), inactiv biologic și care nu se extrage cu acetat de butil. Pentru verificarea ipotezei că substanța străină ar fi acid *6*-aminopenicilanic s-au folosit două metode :

a) Acilarea cu clorură de fenoxiacetil [10], urmată de dozarea microbiologică. La o probă de ape acide cu o activitate de 700 u/ml determinată iodometric și 10 u/ml microbiologic, după acilare s-au găsit 67 u/ml microbiologic.

b) Dozarea iodometrică cu hidroliză enzimatică (cu penicilinază). La aceeași probă de ape acide s-au găsit astfel 79 u/ml. Se constată deci că doar circa o zecime din activitatea determinată iodometric (cu hidroliză alcalină) ar putea fi acid *6*-aminopenicilanic.

Recent, a fost izolată din lichide de fermentație ale unei tulpini de *P. chrysogenum* o penicilină nouă [11], care a fost denumită izopenicilină N (VI), datorită asemănării sale structurale cu penicilina N (VII), numită înainte cefalosporină N sau sinematină B. Ultima este produsă de o tulpină de *Cephalosporium* și a fost descrisă încă din 1951 [12]. Diferența între izopenicilina N și penicilina N constă doar în configurația sterică a catenei laterale (la prima *R-L*-aminoadipil, la ultima *R-D*-aminoadipil). Producerea de către două microorganisme diferite a acestor două substanțe complexe atît de asemănătoare a permis să se presupună că și mecanismele de biosinteză ar fi identice la cele două microorganisme. Atît izopenicilina N cît și penicilina N sînt hidrofile, au activitate antimicrobiană foarte mică, sînt ușor inactivate de către penicilinază și nestabile în mediu acid. Substanța cercetată, deși hidrofilă și cu activitate antimicrobiană scăzută, este în schimb rezistentă la penicilinază și relativ stabilă în mediu acid : o soluție apoasă dintr-un preparat brut cu 100 u/mg (dozare iodometrică, exprimată în benzilpenicilină), în 72 de ore la pH 3,5 și la temperatura camerei a pierdut doar 12% din activitate. Posibilitatea ca substanța noastră să fie izopenicilină N este exclusă.

Încă în 1955 [13] a fost izolată cefalosporina C (IX) produsă de același *Cephalosporium* care produce și penicilina N. Structura ei a fost complet determinată în 1961 [14]. Spre deosebire de peniciline, la care ciclul β-lactamic este condensat cu un ciclu tiazolidinic, în cazul cefalosporinei C ciclul β-lactamic e condensat cu un ciclu dihidrotiazinic. Structura aceasta nouă, cefalosporinică, conferă o stabilitate mare ciclului β-lactamic, atît la acțiunea penicilinazei cît și în mediu acid, proprietăți verificate pe cefalosporine de semisinteză [15], preparate prin acilarea acidului 7-aminocefalosporanic (VIII). Dintre aceste cefalosporine de semisinteză, una, numită cefalotină (X), a și fost experimentată clinic cu succes.

Datorită faptului că :

a) substanța noastră este stabilă în mediu acid ;

b) este rezistentă la penicilinază ;

c) degradarea ei alcalină pare a fi de aceeași natură cu degradarea alcalină a cefalosporinei C [16] (se formează produși cu proprietăți reducătoare) ;

d) este stabilită o mare asemănare între căile de biosinteză a celor două microorganisme ; se presupune că substanța care interferă în dozarea iodometrică a penicilinei ar fi de tip cefalosporinic, adică ar

conține un nucleu de acid 7-aminocefalosporanic. Izolarea produsului în stare pură și caracterizarea lui vor da răspunsul definitiv.

Dacă ipoteza se va dovedi justă, identitatea mecanismelor de biosinteză la cele două microorganisme va fi și mai evidentă. În plus, se vor putea obține relativ ușor preparate active față de stafilococii penicilinorezistenți și față de unii germeni Gram-negativi.

Fabrica de antibiotice, Iași

Prezentată la redacție la 6 mai 1963

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ОТНОСИТЕЛЬНО НОВЫХ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА

РЕЗЮМЕ

После извлечения пенициллина из ферментационной жидкости в остаточных водах было обнаружено вещество, которое при йодометрических определениях реагирует как пенициллин.

Приводятся данные, на основании которых можно предположить, что указанное вещество содержит 7-аминоцефалоспорановую кислоту.

DONNÉES PRÉLIMINAIRES SUR UN NOUVEAU PRODUIT MÉTABOLIQUE DU *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

RÉSUMÉ

Après extraction des pénicillines du bouillon de fermentation, on constate dans les eaux résiduelles la présence d'une substance qui se comporte pendant le dosage iodométrique d'une manière analogue aux pénicillines.

L'auteur relate ces expériences et exprime la supposition que cette substance contiendrait le noyau de l'acide 7-amino-céphalosporanique.

BIBLIOGRAFIE

1. Levitov M. M., Lurie L. M., Zavileiskaia G. F., Antibiotiki, **6**, *12*, 1058 (1961).
2. Bethel M. M., Bond C. R., Analyst, **86**, *1024*, 448 (1961).
3. Bruner T., Oster. Zt., **54**, *9—10*, 138 (1953).
4. Flines J., Waisvisz J. M., Hoette I., Struyk A. P., Antib. Chemoth., **7**, *9*, 497 (1957).
5. Korzybski T., Kurylowicz W., *Antibiotika*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1961, p. 773.

6. BATCHELOR F. R., DOYLE F. P., NAYLER J. H. C., ROLINSON G. N., Nature (London), **183**, *4656*, 257 (1959).
7. LEVITOV M. M., KLAPOVSKAIA K. I., IUDINA O. D., Antibiotiki, **4**, *6*, 18 (1959).
8. LEVITOV M. M., GOTOVTEVA V. A. şi ZAVILEISKAIA G. F., Antibiotiki, **7**, *5*, 410 (1962).
9. HALAMA D. V., MARTONOVA E. J., Antibiotiki, **7**, *5*, 398 (1962).
10. KORCIAGHIN V. B., ERMAKOVA N. M., DRUJININA E. N., Antibiotiki, **7**, *5*, 449 (1962).
11. FLYNN E. N., MC CORMICK M. H., STAMPER M. C., GODZESKI C. W., J. Am. Chem. Soc., **84**, *23*, 4594 (1962).
12. BURTON H., ABRAHAM E. P., Biochem. J., **50**, 168 (1951).
13. NEWTON G. G. F., ABRAHAM E. P., Nature (London), **175**, 548 (1955).
14. ABRAHAM E. P., NEWTON G. G. F., Biochem. J., **79**, 377 (1961).
15. CHAUVETTE R. R., FLYNN E. N., J. Am. Chem. Soc., **84**, *17*, 3401 (1962).
16. ALICINO J. F., Anal. chem., **33**, *4*, 648 (1961).

INTERACȚIUNEA UNOR SĂRURI CUATERNARE DE AMONIU FLUORESCENTE CU PROTEINELE MUSCULARE

DE

H. D. SCHELL

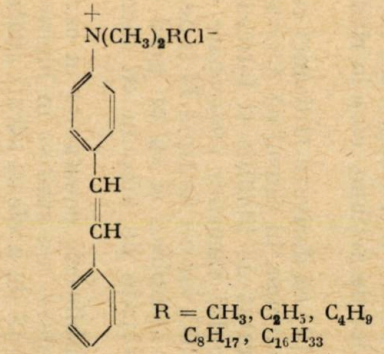
Studiind într-o lucrare anterioară [1] interacțiunea proteinelor serice cu unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente, derivate de la stilben [2], am constatat o comportare diferită la cele două tipuri de derivați stilbenici cercetați (schema 1): în timp ce produșii de tipul I formau complecși fluorescenți, în mod preferențial cu fracțiunea α_1-globulinică a proteinelor serice, cei de tipul II nu reacționau deloc cu acestea.

Extinzînd cercetările și asupra altor săruri cuaternare de amoniu, dintre care unele au intrat de mult în clinică, ca relaxanți musculari, am constatat că și dintre acestea unele formează complecși cu proteinele serice, iar altele nu. Am putut observa totodată că sărurile care formează complecși aparțin substanțelor curarizante cu mecanismul de acțiune de tipul *d*-tubocurarinei, iar sărurile care nu acționează cu proteinele serice aparțin agenților depolarizanți de tipul succinilcolinei.

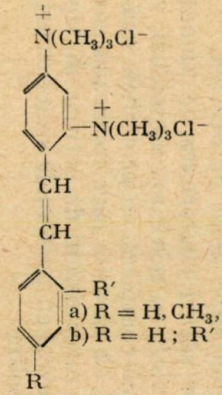
Comportarea acestor produși față de proteinele serice sugerează ideea că ea ar putea fi în legătură cu mecanismul lor de acțiune, care la rîndul lui depinde de structura lor chimică.

Pornind de la această idee, am arătat [3] că derivații stilbenici cercetați se deosebesc prin mecanismul lor de acțiune, în sensul că derivații de tipul I, care posedă un grad mai pronunțat de lipofilie și formează complecși cu proteinele serice, aparțin grupului sărurilor cuaternare de amoniu cu mecanismul de acțiune de tipul *d*-TC, iar cei de tipul II și derivatul de la *o*-dianisidină, care nu formează complecși și au un grad de lipofilie mai scăzut, aparțin sărurilor cuaternare de amoniu cu mecanismul de acțiune de tipul succinilcolinei.

Pentru a cerceta în ce măsură sînt valabile cele constatate în cazul proteinelor serice și pentru proteinele musculare, s-a studiat în lucrarea de față comportarea proteinelor musculare față de aceleași săruri cuater-

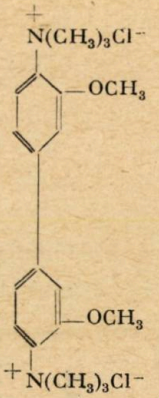


Tip I

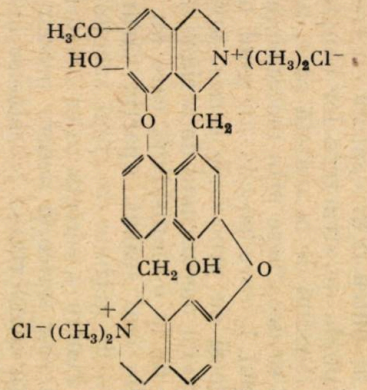


Tip II

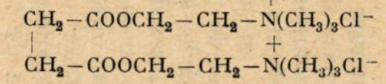
Derivații de la stilben



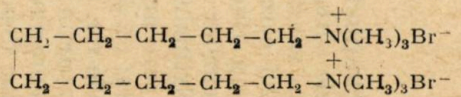
Derivatul de la *o*-dianisidină



d — Tubocurarină



Succinilcolina



Decametoniu

nare de amoniu folosite și în cazul proteinelor serice. S-a urmărit dacă și în cazul proteinelor musculare se formează complecși în mod preferențial cu anumite fracțiuni și dacă și în acest caz se constată existența celor două categorii de săruri cuaternare de amoniu : grupul celor care formează și grupul celor care nu formează complecși. S-a lucrat cu extracte musculare care conțineau proteinele sarcoplasmatice de la animale cu sînge rece și cu sînge cald.

Semnalăm cu această ocazie apariția recentă a unor lucrări efectuate concomitent sau după cercetările noastre, în care se studiază interacțiunea unor săruri cuaternare de amoniu cu proteinele extractelor obținute din țesutul nervos. Astfel, se pot aminti lucrările lui S. Ehrenpreis [4] [5] [6] și A. Hassón [7] [8] [9], care au lucrat pe extracte din organul electric de la *Electrophorus electricus* L., precum și lucrarea lui K. E. Neet și S. L. Friess [10], care au lucrat cu extracte obținute din nervul sciatic de la broască și cîine. Autorii citați constată de asemenea o formare de complecși între unele săruri cuaternare de amoniu și anumite fracțiuni proteice și presupun că proteina care formează complexul cu sarea cuaternară ar fi receptorul specific pentru acetilcolină și alte săruri cuaternare de amoniu. Această problemă este însă discutabilă [9] [11]. În această ordine de idei, este interesant de subliniat și paralelismul ce se constată în comportarea acelor săruri cuaternare de amoniu care au fost folosite atît în lucrările noastre, cît și în cele ale autorilor citați : sărurile care formează complecși în cazul proteinelor serice și musculare dau complecși și cu proteinele extractelor organului electric și ale nervului sciatic, iar acelea care nu reacționează deloc cu proteinele studiate de noi, nu dau complecși nici cu proteinele studiate în lucrările citate mai sus.

MATERIAL ȘI METODE

Comportarea proteinelor musculare față de sărurile cuaternare de amoniu s-a studiat pe extracte proteice obținute din mușchi striați de la animale cu sînge rece (gastrocnemian de broască) și cu sînge cald (mușchii striați de la piciorul posterior de șobolan). Extragerea proteinelor musculare s-a făcut cu tampon de fosfați cu pH 7,6 și forță ionică 0,15, după indicațiile lui B. S. Kasavina și I. M. Torcinski [12]. În acest scop, mușchii striați izolați erau repede cîntăriți, mărunțiți cu o foarfecă și apoi majorați, împreună cu puțin nisip de cuarț, într-un mojar de porțelan răcit în prealabil. Omogenatul obținut s-a tratat apoi cu tampon fosfați, de asemenea în prealabil răcit (0°—2°C), și s-a lăsat în frigider timp de 2 ore. Volumul tamponului adăugat a fost de 1 ml/g țesut. După aceasta suspensia s-a centrifugat timp de 15 min la 6 000 ture/min. Supernatantul rezultat se poate utiliza direct în cercetările ulterioare, fără dializă prealabilă.

Pentru urmărirea interacțiunii proteinelor musculare cu sărurile cuaternare de amoniu, s-a lucrat în condiții similare cu acelea folosite în cazul proteinelor serice [1]. Peste un anumit volum de extract muscular, de exemplu 0,5 ml, s-a adăugat picătură cu picătură o cantitate egală din soluția sării cuaternare de amoniu de cercetat, a cărei concentrație a variat între 0,01—8% (0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 și 8% ; s-a lucrat și cu concentrații intermediare de 1,5 ; 2 ; 2,5%, deoarece aspectul proteinogramelor prezenta o modificare bruscă între concen-

traţiile 1 şi 3%). S-a agitat şi s-a lăsat amestecul să stea 60 min la temperatura camerei, notîndu-se schimbările observate în eprubetă la 5 min şi la 60 min după adăugarea soluţiei sării cuaternare de amoniu. Apoi s-a centrifugat proba timp de 5 min la 4 000 ture/min, pentru depunerea complexului separat, iar supernatantul decantat s-a supus analizei electroforetice pe hîrtie.

În vederea studierii proprietăţilor sale fizico-chimice, complexul depus s-a spălat de 3—4 ori cu tampon fosfaţi sau apă distilată, centrifugînd de fiecare dată pînă la dispariţia completă a urmelor proteice şi de sare cuaternară din supernatant.

Pentru a controla dacă timpul de o oră ales de noi pentru interacţiunea proteinelor musculare cu sărurile cuaternare de amoniu este suficient pentru terminarea reacţiei, o parte alicotă a probelor a fost păstrată, după centrifugare, la temperatura de 0°C, timp de 24, 48 sau chiar 72 de ore. Nu s-a putut observa la nici o probă vreo schimbare în aspectul ei, faţă de cel iniţial observat după o oră.

Analizele electroforetice au fost efectuate la început în tampon de fosfaţi[12] şi apoi într-un tampon de fosfaţi cu adaus de glicocol, propus de S. Vasilevschi [13]. Deoarece însă nu am fost mulţumiţi cu puterea de rezoluţie a acestor soluţii tampon, ne-am fixat în cele din urmă la tamponul veronal-medinal cu pH 8,6 şi forţă ionică 0,05 [14], folosind următoarele condiţii de migrare electroforetică: tensiunea 8 V/cm, intensitatea 0,33 mA/cm, durata de migrare 11 ore, tempergtura +18°C. S-a folosit hîrtie Whatman nr. 1, tăiată în benzi de 3 × 26 cm sau 6 × 26 cm. Cantităţile aplicate pe benzile destinate cercetării proteinelor şi glucoproteinelor au fost de 20 μl, iar la benzile destinate cercetării lipoproteinelor de 40 μl. Drept martor a servit o parte din extractul proteic la care, în locul soluţiei de sare cuaternară de amoniu, s-a adăugat apă distilată în raportul de 1 : 1.

După terminarea electroforezei benzile erau uscate la temperatura camerei, apoi fixate la 110°C timp de 10—15 min.

Proteinele au fost relevate prn colorare cu albastru de bromfenol. În unele cazuri s-au efectuat şi determinări cantitative, prin metoda eluţiilor şi colorimetrare la fotometrul Pulfrich (cuva d = 0,5; filtru λ = 533 mμ).

Glucoproteinele au fost relevate prin colorare cu albatru de toluidină [15]. Prin colorarea directă a benzilor au fost puse în evidenţă glucoproteinele acide. S-a folosit această colorare şi după o oxidare prealabilă a polizaharidelor de pe elctroforegrame, cu acid periodic şi apă de brom, pentru punerea concomitentă în evidenţă atît a polizaharidelor neutre cît şi a celor acide.

Pentru relevarea lipoproteinelor s-a folosit coloraţia cu negru Sudan B [16], fără a se obţine însă rezultate mulţumitoare.

În lucrarea de faţă s-a studiat comportarea proteinelor musculare faţă de următoarele săruri cuaternare de amoniu: derivaţii de la stilben de tipul I, şi anume clorura de *4*-trimetil-amoniu-stilben, clorura de *4*-dimetil-etil-amoniu-stilben, clorura de *4*-dimetil-butil-amoniu-stilben, clorura de *4*-dimetil-octil-amoniu-stilben, clorura de *4*-dimetil-cetil-amoniu-stilben; derivaţii de la stilben de tipul II şi anume: diclorura de *2,4-bis*-(trimetil-amoniu)-stilben, diclorura de *2,4-bis*-(trimetil amoniu)-*4'*-metoxi-stilben, diclorura de *2,4-bis*-(trimetil-amoniu)-*2'*-metoxi-stilben, diclorura de *2,4-bis*-(trimetil-amoniu)-*4'*-metil-stilben, precum şi diclorura de *4,4'-bis*-(trimetil-amoniu)-*3,3'*-dimetoxi-difenil, un produs nou, obţinut de noi prin cuaternizarea *o*-dianisidinei, care de asemenea prezintă o fluorescenţă albastră în lumina ultravioletă. Pentru a vedea cum se comportă proteinele musculare şi faţă de alte substanţe curarizante, s-au folosit şi unele săruri cuaternare de amoniu cunoscute de mult în literatură, cum sînt: *d*-tubocurarina (diclorura), decametoniul (dibromura) şi succinilcolina (diclorura).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dacă extractul muscular de gastrocnemian de broască ce cuprinde proteinele sarcoplasmatice se tratează cu o soluție 3% de clorură de *4*-trimetil-amoniu-stilben, se observă la început apariția unei slabe opalescențe, urmată de o separare de flocoane fine, care se depun cu timpul. Analizînd electroforetic supernatantul obținut în urma centrifugării extractului tratat, se constată lipsa fracțiunii *d* din grupa a II-a a proteinelor sarcoplasmatice (notație după M. Dubuisson [18]). În același timp nu se constată modificări la nivelul celorlalte fracțiuni proteice ale extractului muscular, nici în viteza lor de migrare electroforetică și nici în concentrația lor relativă (fig. 1 *a*).

Depozitul obținut în urma centrifugării extractului muscular tratat cu sarea cuaternară de amoniu și spălat de repetate ori cu apă distilată posedă în lumina ultravioletă o puternică fluorescență albastră, similară cu aceea a sării cuaternare de amoniu adăugate. Sarea cuaternară de amoniu a reacționat deci în mod preferențial, fără să-și piardă fluorescența în lumina ultravioletă, cu fracțiunea *d*, formînd un complex : proteină-sare cuaternară de amoniu. Legarea sării cuaternare de amoniu de proteină se realizează, probabil, prin sarcinile ei pozitive de la atomul de azot cuaternar, care reacționează cu sarcinile negative ale proteinei în așa fel încît părțile hidrofobe din molecula sării cuaternare să fie îndreptate în afară, adică spre faza apoasă. Scăderea considerabilă a solubilității, care se produce în felul acesta, duce la precipitarea complexului.

Complexul format are un aspect albicios, amorf, este stabil, nu se solvă în soluții saline și în soluții tampon cu un pH cuprins între 3,2—9,6 ; nu se solvă de asemenea în etanol și acetonă. Acest complex se solvă însă în soluții diluate de NaOH 0,25—0,5% (pH aproximativ 11), desfăcîndu-se legătura dintre proteină și sarea cuaternară. Supunînd electroforezei pe hîrtie soluția obținută prin dizolvarea complexului, componenta proteică se comportă ca un compus omogen din punct de vedere electroforetic, migrînd spre anod sub forma unui singur spot (fig. 4 *a*) ; în același timp sarea cuaternară de amoniu se deplasează în sens invers, spre catod, tot sub forma unui singur spot, pentru a dispare în cele din urmă de pe banda de hîrtie, în cuvă.

Glucidogramele obținute din supernatantul rezultat în urma centrifugării extractului muscular tratat cu sarea cuaternară de amoniu nu dau indicații suplimentare (fig. 1 *b*). Se constată atît în cazul polizaharidelor acide, cît și în acela al polizaharidelor neutre + acide lipsa fracțiunii de la nivelul fracțiunii proteice *d*. Dacă se compară de altfel proteinograma cu glucidograma, se constată, ca și în cazul proteinelor serice, în dreptul fiecărei fracțiuni proteice prezența unei reacții pozitive pentru polizaharide. Astfel, se obține o reacție pozitivă cu albastrul de toluidină în dreptul fracțiunii proteice și în cazul glucidogramei complexului dizolvat (fig. 4 *b*), ceea ce indică prezența polizaharidelor și în această fracțiune.

În formarea complexului, un factor important este concentrația soluției sării cuaternare de amoniu folosite. Acest lucru se poate vedea

ușor din tabela 1. Tratînd extractul muscular de gastrocnemian de broască cu soluții de concentrații crescînde în clorură de *4*-trimetil-amoniu-stilben, se constată începînd de la o concentrație de 0,05—0,1% formarea unei slabe opalescențe, pentru ca apoi, la concentrația de 0,5—1%, să aibă loc o separare de flocoane fine. La concentrația de 3% cantitatea complexului separat sub forma de precipitat floconos este maximă. Mărind și mai mult concentrația soluției sării cuaternare de amoniu adăugate, se constată pentru concentrația de 5% o micșorare considerabilă a cantității

Tabela 1

Influența concentrației sării cuaternare de amoniu (clorura de *4*-trimetil-amoniu-stilben) asupra formării complexului cu proteinele musculare la broască

Concentrația soluției (%)	Schimbările observate la extractul muscular de gastrocnemian de broască tratat cu soluția sării cuaternare de amoniu (1 : 1)			Cantitatea complexului fluorescent rămas pe linia de start a electroforegramei
	După 5 minute	După 60 de minute la temperatura camerei	Cantitatea complexului depus după centrifugare	
0,01	Nici o schimbare	Nici o schimbare	—	—
0,05	Nici o schimbare	Slab opalescent	—	—
0,1	Slab opalescent	Flocoane foarte fine în suspensie	(+)	—
0,5	Flocoane fine în suspensie	Flocoane cu tendință de depunere	++	—
1	Flocoane în suspensie	Flocoane abundente cu tendință de depunere	+++	—
3	Flocoane abundente în suspensie	Depozit abundent floconos	++++	+
5	Flocoane în suspensie (ca la proba de 1%)	Flocoane cu tendință de depunere	++	+++
8	Slab opalescent	Urme de flocoane fine	(+)	++++

de flocoane separate, ca apoi la concentrația de 8% să se observe din nou doar o slabă opalescență sau cel mult urme de flocoane foarte fine. Examinînd electroforegramele obținute din supernatantul acestor probe (fig. 2), se constată în cazul proteinogramelor următoarele: de la concentrația de 1% începe o diminuare progresivă a fracțiunii *d* din cea de a doua grupă a proteinelor sarcoplasmatice de broască, fracțiune care dispare complet la concentrația de 3%, adică atunci cînd cantitatea precipitatului este maximă, fără să se producă însă în același timp schimbări la nivelul celorlalte fracțiuni. Cu mărirea concentrației sării cuaternare de amoniu adăugate la 5% și 8%, cantitatea de complex insolubil separat se micșorează considerabil și dispare practic complet la concentrația de 8%, formîndu-se în schimb, în aceeași măsură, o cantitate crescîndă de complecși fluorescenți, care rămîn pe linia de start a electroforegramelor. În același timp se observă o diminuare progresivă și la celelalte fracțiuni, mai întîi la nivelul fracțiunilor $a_1 + a_2$, apoi și la rest.

Trecerea în soluție a complexului separat inițial cu formare de complecși solubili, o dată cu creșterea concentrației de clorură de *4*-tri-

metil-amoniu-stilben, s-ar putea explica, întocmai ca și în cazul unor complecși dintre proteine și unele săpunuri anionice [18] [19] și cationice [20], prin faptul că datorită forțelor Van der Waals, sarea cuaternară adăugată în exces se orientează, cu grupările ei apolare, lipofile, spre părțile hidrofobe ale complexului, în așa fel încît grupările ei polare, hidrofile, să fie îndreptate spre faza apoasă, ceea ce duce la solubilizarea complexului. Constatările făcute cu ocazia studierii electroforegramelor în lumina ultravioletă vin în sprijinul acestei interpretări. La electroforegramele obținute de la probele tratate cu concentrații mai ridicate de clorură de *4*-trimetil-amoniu-stilben, unde s-au format deci complecșii solubili, se observă astfel o cantitate crescîndă de proteină fluorescentă rămasă pe linia de start (fig. 1, fig. 3 *a*). Complecșii solubili fiind încărcați pozitiv, ar fi trebuit să se deplaseze în cîmpul electric spre catod. Rămînerea totuși pe linia de start a unui spot proteic fluorescent denotă o desfacere a complexului solubil sub acțiunea curentului electric, prin plecarea moleculelor de sare cuaternară de amoniu mai labil legate (legăturile realizate prin forțe Van der Waals, fiind, după cum se știe legături relativ slabe), rămînînd fixate doar acele molecule de sare cuaternară care sînt legate mai puternic de proteine, prin forțe electrostatice, și care neutralizînd cu sarcinile lor pozitive pe cele negative ale moleculei proteice, fac ca aceasta să nu mai migreze în cîmpul electric.

Faptele observate în cazul clorurii de *4*-trimetil-amoniu-stilben sînt valabile pentru întreaga serie omologă, adică pentru toate clorurile de *4*-dimetil-alchil-amoniu stilben, unde alchil=metil, etil, butil, octil și cetil. La derivații stilbenici de tipul II însă, nu se observă nici un fel de interacțiune între acestea și proteinele musculare, nici cu ocazia adăugării lor la extractul proteic și nici pe electroforegramele obținute.

Studiind comportarea proteinelor sarcoplasmatice și față de alte săruri cuaternare de amoniu, dintre care unele sînt folosite ca relaxanți musculari în practica medicală, am găsit că în timp ce *d*-TC se comportă ca derivații stilbenici de tipul I, decametoniul, succinilcolina și derivatul de la *o*-dianisidină nu reacționează deloc cu proteinele din extractul muscular, ca și derivații stilbenici de tipul II. Dacă se analizează structura chimică a acestor compuși, se constată la cei care formează complecși un grad de lipofilie mai pronunțat în comparație cu cei care nu reacționează cu proteinele. Pentru a putea forma complexul, nu este deci suficient ca compusul să posede una sau mai multe grupări cuaternare de amoniu ci, pe lîngă acestea, el trebuie să posede și un anumit grad de lipofilie. Partea lipofilă, apolară, a moleculei poate interveni mai mult sau mai puțin favorabil în producerea legăturii dintre proteină și sarea cuaternară, prin factori sterici, forțe Van der Waals, punți de hidrogen.

De remarcat este și faptul că cele două categorii de săruri cuaternare de amoniu se deosebesc și prin mecanismul lor de acțiune în producerea blocării transmisiei neuromusculare. Astfel, în timp ce compușii care formează complexul proteină-sare cuaternară aparțin agenților de blocare competitivă, ceilalți, care nu dau acești complecși, aparțin agenților depolarizanți. Gruparea apolară, lipofilă , a sărurilor cuaternare de amoniu

pare să aibă deci un rol important şi bine determinat în imprimarea proprietăţilor fizico-chimice şi farmacologice ale acestor produşi. Faptul acesta vine în sprijinul ipotezei enunţate de către acad. E. Macovschi în 1955 [21], precum şi altor autori [22] [23] care, pe lîngă partea polară, atribuie un rol important şi părţii lipofile, apolare, a moleculei sării cuaternare de amoniu în acţiunea specifică a acestor compuşi.

Studiind interacţiunea sărurilor cuaternare de amoniu amintite mai sus cu proteinele sarcoplasmatice de la animale cu sînge cald, se con-

Tabela 2

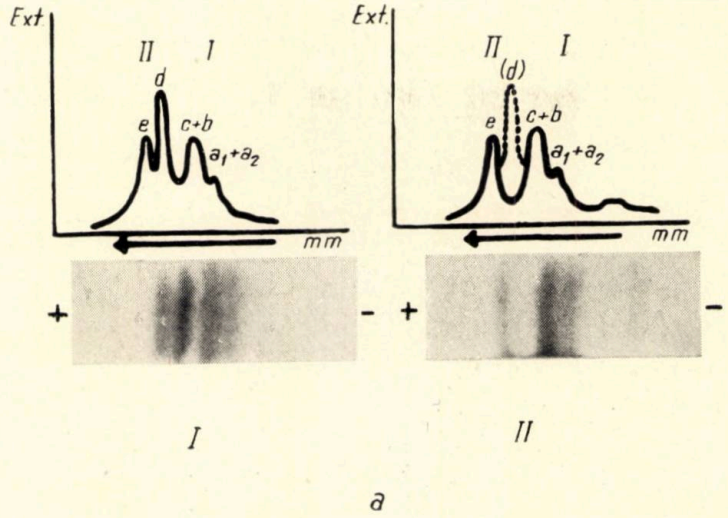
Influenţa concentraţiei soluţiei sării cuaternare de amoniu (clorura de 4-trimetil-amoniu-stilben) asupra formării complexului cu proteinele musculare la şobolan

Concentraţia soluţiei (%)	Schimbările observate la extractul muscular de muşchi striaţi de şobolan tratat cu soluţia sării cuaternare de amoniu (1 : 1)			Cantitatea complexului fluorescent rămas pe linia de start a electroforegramei
	După 5 minute	După 60 minute la temperatura camerei	Cantitatea complexului depus după centrifugare	
0,01	Nici o schimbare	Nici o schimbare	−	−
0,05	„ „ „	„ „ „	−	−
0,1	„ „ „	Slab opalescent	(+)	−
0,5	Opalescent	Flocoane cu tendinţă de depunere	++	−
1	Flocoane fine în suspensie	Flocoane abundente depuse	++++	+
3	Flocoane abundente în suspensie	Flocoane abundente depuse	+++	++
5	Opalescent (ca la 0,5%)	Opalescent	(+)	++++
8	Nici o schimbare	Nici o schimbare	−	++++

stată în principiu o comportare similară a proteinelor musculare, atît cu ocazia adăugării soluţiei sării cuaternare de amoniu la extractul proteic (tabela 2) cît şi la examenul electroforetic al supernatantului probelor centrifugate. Fracţiunea proteică care reacţinează cu sarea cuaternară de amoniu face parte din grupa I a proteinelor sarcoplasmatice (fig. 3 *a*).

Un alt factor care influenţează formarea complexului, este temperatura la care se efectuează experienţele. Astfel, am putut observa că în timp ce la extractele de la broască şi peşte formarea complexului (floculare) are loc uşor la temperatura camerei, în cazul extractului muscular de la şobolan floculare se produce mai încet la temperatura camerei, mai uşor însă la 37°C, iar în cazul extractului muscular de la porumbel floculare nici nu se produce decît la o temperatură în jur de 37°C. Temperatura la care se formează complexul proteină-sare cuaternară de amoniu pare a fi în legătură şi cu temperatura corpului speciei respective.

Tatonări prealabile efectuate pe proteinele din creier, au arătat de asemenea o comportare asemănătoare cu cea a proteinelor serice şi musculare faţă de sărurile cuaternare de amoniu; rezultatele obţinute vor forma obiectul unei lucrări viitoare.



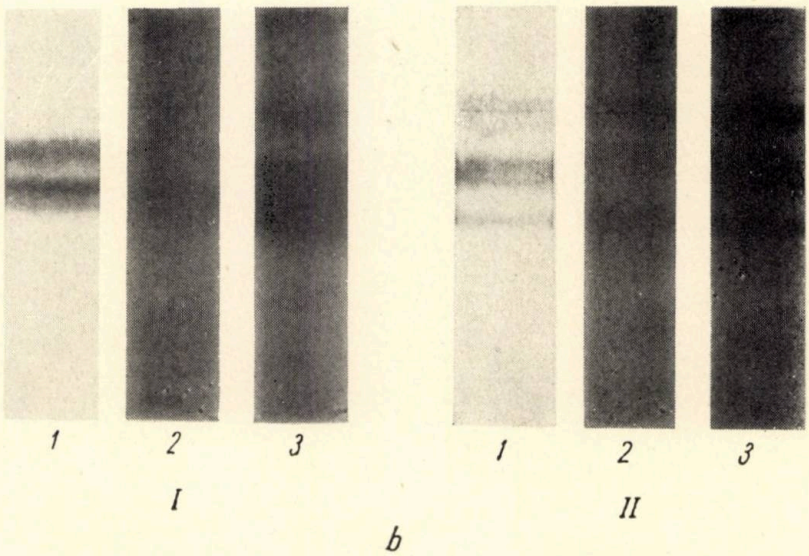


Fig. 1. — *Electroforegramele supernatantului extractului muscular de gastrocnemian de broască tratat cu o soluție de clorură de 4-trimetilamoniu-stilben 3%.*

a proteinogramele; *b*) glucidogramele.

1 — proteine; *2* — polizaharidele acide; *3* — polizaharidele neutre + acide.

I — extract muscular martor; *II* — extract muscular tratat.

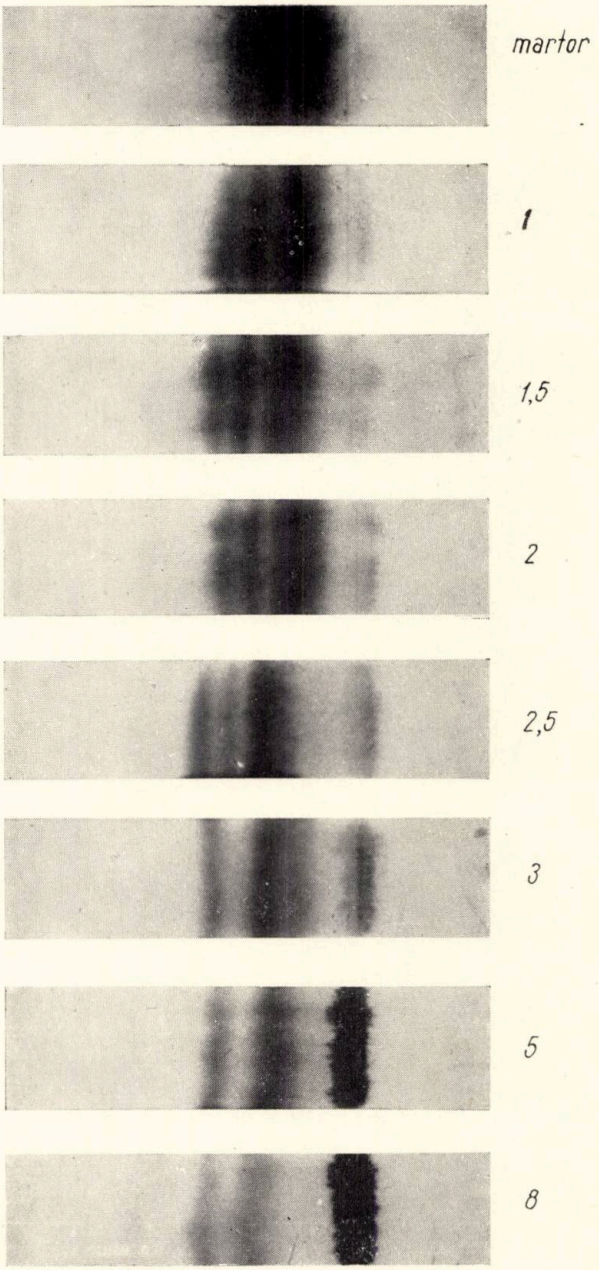


Fig. 2. — *Proteinogramele supernatantului extractului muscular de gastrocnemian de broască tratat cu soluții de clorură de 4-trimetilamoniu-stilben de concentrații diferite, indicate în dreptul fiecărei benzi în parte.*

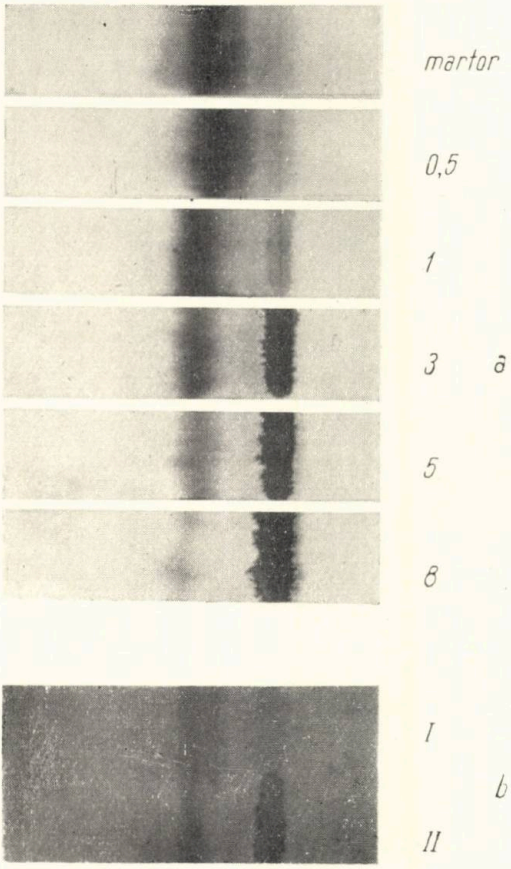


Fig. 3. — *Electroforegramele supernatantului extractului muscular de șobolan tratat cu soluții de clorură de 4-trimetilamoniu-stilben de concentrații diferite, indicate în dreptul fiecărei benzi în parte.*

a) proteinogramele; *b*) glucidograma.

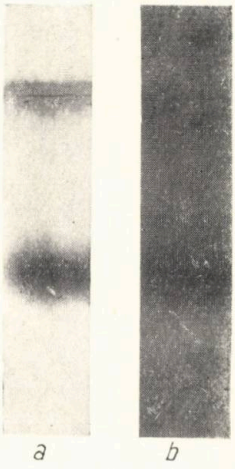


Fig. 4. — *Electroforegramele complexului dizolvat în hidroxid de sodiu 0,1 N.*

a) proteinograma; *b*) glucidograma.

CONCLUZII

1. Sărurile cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben, de tipul clorurilor de *4*-dimetil-alchil-amoniu-stilben, adăugate extractului muscular de gastrocnemian de broască, formează complecși fluorescenți în mod preferențial cu fracțiunea *d* din grupa a II-a a proteinelor sarcoplasmatice, notate după M. Dubuisson.

2. Complexul separat sub formă de flocoane albicioase se solvă în soluții diluate de NaOH, prin desfacerea legăturii dintre proteină și sarea cuaternară de amoniu. Supunînd electroforezei pe hîrtie soluția obținută prin dizolvarea complexului, se observă un spot proteic omogen, care se deplasează spre anod, în timp ce sarea cuaternară se deplasează spre catod, sub forma unui singur spot fluorescent.

3. Un rol important în formarea complexului îl joacă concentrația soluției sării cuaternare de amoniu adăugate. La concentrația de 3%, cantitatea complexului separat sub formă de flocoane este maximă: totalitatea fracțiunii *d* se separă sub formă de complex, fără ca celelalte fracțiuni proteice să fie afectate. Cu creșterea concentrației, cantitatea complexului separat se micșorează, dispărînd practic complet la concentrația de 8%, cu formare concomitentă de complecși solubili. În același timp se constată schimbări și la nivelul celorlalte fracțiuni proteice.

4. La formarea complexului joacă un rol și temperatura la care se efectuează experiențele. Ea este în legătură, într-o oarecare măsură, cu temperatura corpului animalului de experiență.

5. Nu toate sărurile cuaternare de amoniu luate în studiu formează complecși cu proteinele musculare. Sărurile cuaternare care formează acești complecși au un grad de lipofilie mai pronunțat în comparație cu sărurile care nu formează complecși. Se constată totodată că aceste două categorii de compuși—cei care reacționează și cei care nu reacționează cu proteinele sarcoplasmatice — se deosebesc și prin mecanismul lor de acțiune în producerea blocării transmisiei neuromusculare.

6. Cercetări efectuate pe extracte musculare de la alte animale, atît cu sînge rece (pești) cît și cu sînge cald (porumbel, șobolan), au arătat că, în principiu, acestea se comportă față de diferitele săruri cuaternare de amoniu studiate, în mod similar extractului muscular de broască.

7. Legarea sărurilor cuaternare de amoniu de anumite fracțiuni proteice, cu formare de complecși izolabili, ar putea prezenta interes pentru separarea unor fracțiuni proteice anumite dintr-un amestec de proteine.

8. Rezultatele obținute cu ocazia studierii interacțiunii sării cuaternare de amoniu cu proteinele musculare au arătat că acestea din urmă se comportă asemănător cu proteinele serice.

9. Proprietatea proteinelor de a reacționa cu o serie de săruri cuaternare de amoniu cu formare de complecși pare a fi deci o însușire mai generală, nelegată neapărat de o proteină specifică unui anumit țesut.

Institutul de biochimie al
Academiei R.P.R., București

Prezentată la redacție la 15 iulie 1963

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ НЕКОТОРЫМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМИ ЧЕТВЕРТИЧНЫМИ СОЛЯМИ АММОНИЯ И МЫШЕЧНЫМИ ПРОТЕИНАМИ

РЕЗЮМЕ

Исследуя взаимодействие между мышечными протеинами и некоторыми флюоресцентными четвертичными солями аммония, полученными из стилбена и о-дианизидина — недавно синтетизированных препаратов, — а также между некоторыми уже давно известными и примененными в качестве мышечных релаксантов четвертичными солями аммония, было установлено, что четвертичные флюоресцирующие соли аммония, полученные из стилбена и по типу напоминающие хлористый 4-диметил-алкил-аммоний-стилбен (алкил = метил, этил, бутил, октил, цетил), добавленные к мышечному экстракту, полученному из икроножной мышцы лягушки, образуют флюоресцентные комплексы, предпочтительно с фракцией *d* из группы II, согласно М. Дюбюиссону, протеинов саркоплазмы.

Комплекс растворяется в разбавленных растворах едкого натрия путем разрыва связей между протеином и четвертичной солью аммония.

Большую роль в образовании комплекса играет концентрация добавленного раствора четвертичной соли аммония, при температуре, при которой автор производил свои опыты.

Не все исследованные автором четвертичные соли аммония образуют комплексы с мышечными протеинами. В отношении четвертичных солей, образующих эти комплексы, отмечается более выраженная степень липофилии по сравнению с другими солями, не образующими эти комплексы. Вместе с тем автор отметил, что эти две категории производных отличаются друг от друга и механизмом своего действия при наступлении блокады нейромышечной передачи.

Исследования, осуществленные с использованием мышечных экстрактов, полученных у других холоднокровных животных (рыбы), а также у теплокровных животных (голуби, крысы), показали, что эти экстракты в принципе действуют также как и мышечные экстракты, полученные у лягушки.

Полученные результаты указывают, что существует большое сходство между действием мышечных протеинов и действием сывороточных протеинов в отношении исследованных четвертичных солей аммония.

Свойство протеинов вступать в реакцию с рядом четвертичных солей аммония и последующим образованием комплексов, по-видимому, является более общим свойством, которое не связано обязательно с наличием протеина, специфического для определенной ткани.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофореграммы надосадочной жидкости мышечного экстракта, полученного из икроножной мышцы лягушки и обработанного 3 %-м раствором хлористого 4-триметиламмония-стилбена. a) протеинограммы; b) глюцидограммы: 1 — протеины, 2 — кислые полисахариды; 3 — нейтральные + кислые полисахариды. I — контрольный мышечный экстракт; II — обработанный мышечный экстракт.

Рис. 2. — Протеинограммы надосадочной жидкости мышечного экстракта, полученного из икроножной мышцы лягушки, обработанного различными концентрациями и различными растворами хлористого 4-триметиламмония-стилбена — для каждой из кривых.

Рис. 3. — Электрсфореграммы надосадочной жидкости экстракта из мышцы крысы, обработанного различными концентрациями хлористого 4-триметиламмония-стилбена — каждая кривая в отдельности. a) протеинограммы; b) глюцидограмма.

Рис. 4. — Электрофореграммы комплекса, растворенного в 0,1 едкого натрия; a) протеинограмма; b) глюцидограмма.

INTERACTION DE QUELQUES SELS QUATERNAIRES D'AMMONIUM FLUORESCENTS AVEC LES PROTÉINES MUSCULAIRES

RÉSUMÉ

En étudiant l'interaction des protéines musculaires avec quelques sels quaternaires d'ammonium fluorescents (dérivés du stilbène et de l'*o*-dianisidine) nouvellement synthétisés, ainsi qu'avec certains sels quaternaires d'ammonium connus et employés comme relaxants musculaires, on a pu constater que les sels quaternaires d'ammonium fluorescents dérivés du stilbène, du type des chlorures de *4*-diméthyl-alkyl--ammonium-stilbène (où alkyl = méthyl, éthyl, butyl, octyl ou cétyl) ajoutés à un extrait de muscle gastrocnémien de grenouille, forment des complexes fluorescents d'une manière préférentielle avec la fraction *d* du deuxième groupe des protéines sarcoplasmatiques, selon la notation de M. Dubuisson.

Ces complexes se dissolvent dans des solutions diluées de NaOH par séparation de la liaison entre la protéine et le sel quaternaire d'ammonium.

Un rôle important dans la formation du complexe est joué par la concentration de la solution de sel d'ammonium quaternaire qu'on ajoute et, d'autre part, par la température à laquelle on effectue les expériences.

De tous les sels quatenaires d'ammonium examinés, une partie seulement forment des complexes avec les protéines musculaires. Chez ceux-ci on a observé un degré de lipophilie plus prononcé que chez ceux qui ne donnent pas de complexes. On constate aussi que ces deux catégories de composés diffèrent par leur mécanisme d'action dans le bloquage de la transmission neuromusculaire.

Des recherches effectuées sur des extraits musculaires d'autres animaux, à sang froid (poisson) et à sang chaud (colombe, rat), ont montré en principe la similarité de leur comportement avec celui des extraits musculaires de grenouille.

Les résultats obtenus démontrent aussi une grande ressemblance entre le comportement des protéines musculaires et celui des protéines sériques vis-à-vis des sels quaternaires d'ammonium étudiés.

La capacité des protéines de réagir avec une série de sels quaternaires d'ammonium avec formation de complexes paraît donc être une propriété plutôt générale qui ne doit pas être nécessairement liée à une protéine spécifique d'un certain tissu.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorégrammes du surnageant de l'extrait du muscle gastrocnémien de grenouille traité à la solution de chlorure de 4-triméthylammonium-stilbène 3 %. En *a*) les protéinogrammes, en *b*) les glucidogrammes : *1* — protéines ; *2* — polysaccharides acides ; *3* — polysaccharides neutres + acides ; I — extrait musculaire témoin ; II — extrait musculaire traité.

Fig. 2. — Protéinogrammes du surnageant de l'extrait de gastrocnémien de grenouille traité aux solutions de 4-triméthylammonium-stilbène de diverses concentrations indiquées en face de chaque bande.

Fig. 3. — Electrophorégrammes du surnageant de l'extrait musculaire de rat traité aux solutions de 4-triméthylammonium-stilbène de concentration variée, indiquée en face de chaque bande. *a*) Protéinogrammes ; *b*) glucidogramme.

Fig 4. — Electrophorégrammes du complexe dissout dans de l'hydroxyde de sodium 0,1 N. *a*) Protéinogramme ; *b*) glucidogramme.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, *Interacțiunea unor substanțe curarizante fluorescente cu proteinele serice*, St cercet. biochimie, *4*, 505—515 (1961).
2. H. D. SCHELL, *Săruri cuaternare de amoniu fluorescente derivate de la stilben*, St. cercet. chimie, *4*, 681—692 (1961).
3. H. D. SCHELL, *Acțiunea antiacetilcolinică și anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben*, St. cercet. biochimie, *6*, 61—70 (1963).
4. S. EHRENPREIS, *Interaction of curare and related substances with acetylcholine receptor-like protein*, Science, **129**, 1613—1614 (1959).
5. S. EHRENPREIS, *Isolation and identification of the acetylcholine receptor-protein of electric tissue*, Biochem. Biophys. Acta, **44**, 561—577 (1960).
6. S. EHRENPREIS, M. G. Kellock, *Acetylcholine receptor protein and nerve activity. I. Specific reaction of local anesthetics with the protein*, Biochem. Biophys. Research Communs., 2, 311—315 (1960).
7. A. HASSÓN, C. CHAGAS, *Selective capacity of components of the aqueous extract of the electric organ to bind curarizing quaternary ammonium derivatives*, Biochem. Biophys. Acta, **36**, 301—308 (1959).
8. A. HASSÓN, J. YON, *Contribution à l'étude de la fixation du curare sur un récepteur, extrait de l'organe électrique de Electrophorus electricus*, Biochem. Biophys. Acta **50**, 389—391 (1961).
9. A. HASSÓN, *Interaction of quaternary ammonium basis with a purified acide polysaccharide and other macromolecules from the electric organ of electric cell*, Biochem. Biophys. Acta, **56**, 275—292 (1962).
10. K. E. NEET, S. L. FRIESS, *Curare-binding macromolecules from medullated nerve tissue*, Arch. Biochem. Bioph., **99**, 484—493 (1962).

11. S. EHRENPREIS, *Electroplax and nerve activity*, Science, **136**, 175—177 (1962).
12. Б. С. КАСАВИНА, Ю. М. ТОРЧИНСКИЙ, Микроэлектрофоретическое исследование белкового состава мышечной ткани в онтогенезе, Биохимия, *21*, 510—515 (1956).
13. СТ. ВАСИЛЕВСКИЙ, К методике электрофореза на бумаге белков мышечной ткани, Лабораторное дело, *8*, 22—24 (1961).
14. S. M. IDU, S. CÎMPEANU, *Electroforeza*, Ed. medicală, București, 1957, p. 40.
15. E. BENHAMON, I. PUGLIESE, J. C. CHICHE, P. ARNOUCH, *La microélectrophorèse sur papier avec le bleu de toluidine et ses applications pratiques*, Presse méd., **62**, 651 (1954).
16. M. BIER, *Electrophoresis, theory, method and applications*, Academic Press., Inc., Publ., New York, 1959, p. 203.
17. M. DUBUISSON, *Les protéines musculaires*, Exp. ann. de biochim. méd., Masson, Paris, 1948, p. 1—72.
18. K. G. A. PANKHURST, R. C. M. SMITH, *Adsorption of paraffin-chain salts to proteins. I. Some factors influencing the formation and separation of complexes between gelatin and dodecylsodium sulfate*, Trans. Faraday Soc., **40**, 565—571 (1944).
19. F. W. PUTNAM, *The interactions of proteins and synthetic detergents*, în Advances in protein chemistry, Vol. 4, Acad. Press, Inc., New York, 1948, p. 80—122.
20. J. POLONOVSKI, *Action des amines quaternaires à chaine grasse sur les protéine, les lipides et les cénapses lipoprotéiques*, Ann. Chim., 671—767 (1950).
21. E. MACOVSCHI, *Dans le domaine des substances curarisantes*, în *Atti XI Congresso Società Italiana di Anestesiologia, Simposio internazionale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti*, Venezia, 12—15 Settembre 1958, p. 121—130.
22. C. J. CAVALLITO, *Influences of lipophilic chemical structures on curarimimetic and other activities of some quaternary ammonium salts*, în *Atti XI Congresso Società Italiana di Anestesiologia, Simposio internationale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti*, Venezia, 12—15 Settembre 1958, p. 149—161.
23. K. NADOR, *Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und pharmakodynamischer Wirkung bei Verbindungen mit lähmendem Effekt der neuromuskulären Transmission*, în *Atti XI Congresso Società Italiana di Anestesiologia, Simposio internationale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti*, Venezia, 12—15 Settembre, 1958, p. 322—332.

CERCETAREA COMPARATIVĂ A PROTEINELOR SARCOPLASMATICE DIN MUSCULATURA STRIATĂ ŞI NETEDĂ

DE

MIHAIL ŞERBAN şi DINU TĂNĂSESCU

Proteinele musculare sarcoplasmatice sînt, în general, încă puţin studiate [1]. Cercetările recente au stabilit că două treimi din aceste proteine sînt de natură enzimatică, şi anume componente ale sistemului glicolitic şi fosfochinazic [2] [3].

Datorită naturii lor enzimatice, se poate considera că proteinele musculare sarcoplasmatice pot să joace un rol metabolic important şi că, în consecinţă, trebuie să existe anumite raporturi între ele şi proteinele miofibrilare, contractile. În acest sens, s-ar putea vorbi şi de o participare indirectă, dar necesară, a proteinelor sarcoplasmatice atît în procesul de contracţie musculară cît şi, în general, în fenomenele legate de excitabilitate.

Pornind de la aceste premise, ne-am propus să cercetăm relaţiile dintre proteinele musculare sarcoplasmatice şi diferite stări de excitaţie, cu scopul precizării rolului pe care aceste proteine l-ar putea avea în procesul excitaţiei ţesutului muscular. În prealabil s-a impus însă, cu necesitate, caracterizarea comparativă a proteinelor sarcoplasmatice pe baza unor criterii fizico-chimice moderne, care să permită cercetarea ulterioară a acestor proteine în scopul şi sensul menţionat.

Prezenta lucrare abordează tocmai acest aspect.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările noastre s-au efectuat asupra proteinelor sarcoplasmatice provenite din musculatura striată (gastrocnemian de broască — *Rana ridibunda*) şi netedă (stomac de broască — *Rana ridibunda*).

Extracţia şi prelucrarea proteinelor musculare sarcoplasmatice s-a făcut după următorul procedeu: probe medii, formate din mai mulţi muşchi izolaţi, spălaţi în prealabil cu o soluţie

fiziologică (la musculatura netedă, după îndepărtarea mucoasei) şi uscaţi cu hîrtie de filtru, s-au îngheţat imediat cu aer lichid. După mojarare, pulberea obţinută s-a cîntărit rapid, adăugîndu-se ulterior pentru extracţia proteinelor o soluţie tampon Tris [tris (hidroximetil)-aminometan] — HCl 0,02 M, cu 0,05 M NaCl, pH 7,55, raportul de extracţie fiind o parte greutate şi cinci volume extractant. Omogenatul obţinut a fost lăsat timp de o oră la +4°C, după care s-a centrifugat 5 minute la 5 500 × g şi apoi 30 de minute la 50 000 × g, la temperatura de + 3°C, folosindu-se o centrifugă cu răcire Janetzky, tip VAK 40. Soluţia proteică astfel obţinută şi perfect clară a fost cercetată prin diverse căi analitice. Concentraţia proteică, determinată înainte şi după dializă, prin metoda Lowry modificată [4], a fost cuprinsă între 0,4—0,5 g% ml, oscilînd între aceleaşi limite pentru proteinele sarcoplasmatice extrase din ambele tipuri de muşchi.

Cromatografia proteinelor sarcoplasmatice s-a efectuat pe o coloană cu DEAE-celuloză (Erich Nickel-Heidelberg), cu o lungime de 12 cm şi un diametru interior de 1,5 cm. Cantitatea de proteină introdusă în coloană a fost cuprinsă între 25 şi 42 mg. În prealabil, soluţia proteică a fost dializată 20 de ore la +4°C faţă de tamponul Tris-HCl 0,02 M (fără NaCl), pH 7,55. Separarea cromatografică s-a efectuat la +18°C, în prezenţa tamponului Tris-HCl 0,02 M, la trei valori de pH (7,55; 8,60 şi 9,00), cu un gradient de concentraţie cuprins între 0 şi 2 M NaCl. Menţionăm că atît la extracţia proteinelor, cît şi la realizarea gradientului de concentraţie am utilizat clorura de sodiu în locul clorurii de potasiu, care, aşa cum am arătat într-o notă anterioară [5], face inaplicabilă metoda Lowry pentru stabilirea diagramelor de fracţionare. Eluţia fracţiunilor proteice de pe coloana cromatografică s-a făcut prin colectare de probe din 3 în 3 ml, debitul de curgere fiind reglat la 0,5 ml pe minut cu ajutorul unui robinet interpus între coloană şi rezervorul cu eluant. Probele eluate au fost determinate atît prin micrometoda Lowry modificată, cît şi prin spectrofotometrie în ultraviolet, cu citirea extincţiilor la 280 şi 260 mμ (s-a folosit în acest scop un spectrofotometru tip Zeiss).

Stabilirea gradientului de concentraţie s-a făcut prin titrare cu $AgNO_3$ N/20, iar rezultatele s-au exprimat în moli de clorură de sodiu.

După fiecare fracţionare, coloana a fost regenerată prin suspendarea răşinei în apă distilată, centrifugare şi apoi prin spălări succesive cu apă distilată, alcool acidifiat, apă distilată, hidroxid de sodiu 0,5 N şi din nou apă distilată; final, s-a echilibrat faţă de tamponul Tris-HCl 0,02 M, pH 7,55.

Fracţiunile obţinute prin cromatografie pe DEAE-celuloză, ca şi proteina totală, au fost analizate ulterior pe cale electroforetică (gel de amidon şi hîrtie), polarografică, precum şi din punct de vedere al compoziţiei în glico- şi lipoproteine. Pentru determinările electroforetice, probele respective au fost liofilizate şi ulterior aduse la o concentraţie convenabilă prin reluare cu tampon borat de pH 8,4.

Electroforeza în gel de amidon s-a efectuat în general după tehnica descrisă de O. Smithies [6]. Amidonul (Merck) a fost hidrolizat cu acetonă clorhidrică, 60 de minute la +37°C, iar gelul a fost preparat în tampon borat pH 8,9 (acid boric 0,025 M—NaOH 0,12 M). Spre deosebire de tehnica originală, gelul astfel obţinut s-a aplicat într-un strat uniform, de 4 mm înălţime, pe plăci de sticlă cu dimensiunea 4/19 cm. Soluţia proteică (30 μl) a fost aplicată pe o bandă de hîrtie Whatman 1, lată cît înălţimea gelului, banda fiind introdusă în prealabil într-o tăietură practicată în gel la o treime din lungimea plăcii. Migrarea electroforetică s-a făcut utilizînd tamponul borat de pH 8,5 (acid boric 0,3 M—NaOH 0,06 M), cu o intensitate de 0,37 mA/cm şi cu o tensiune de 6,6 V/cm, timp de 22 de ore. Înainte de aplicarea soluţiei proteice, gelul a fost echilibrat 30 de minute în aceste condiţii. Evidenţierea tipurilor de proteine separate s-a efectuat prin imersarea plăcilor timp de 3 minute într-o soluţie saturată de Amidoschwartz în metanol-apă-acid acetic (5 : 5 : 1). Îndepărtarea excesului de colorant

s-a făcut prin spălări într-un curent de apă, iar decolorarea finală a fondului, prin imersarea plăcilor într-o soluție de metanol-apă-acid acetic (5 : 5 : 1).

Electroforeza pe hîrtie (Whatman 1) s-a efectuat în aceleași condiții ca și separarea în gel de amidon, pentru migrare utilizîndu-se însă și tamponul veronal-veronal sodic, de pH 8,6 și $\mu = 0{,}05$. Evidențierea tipurilor de proteine separate s-a făcut cu o soluție de 1 % albastru de bromfenol.

Glico- și lipoproteinele, atît în cazul proteinei totale, cît și în cazul fracțiunilor obținute prin cromatografie, au fost puse în evidență prin următoarele tehnici de colorare : glicoproteinele neutre și acide cu albastru de toluidină, după oxidări prealabile cu acid periodic și apă de brom [7], iar lipoproteinele cu negru Sudan [8].

În vederea cercetării polarografice a fracțiunilor separate prin cromatografie pe coloană, s-a procedat în prealabil la egalizarea concentrațiilor proteice ale acestor fracțiuni, în raport cu cea mai diluată, după care s-au analizat în prezența unei soluții test care cuprindea : clorură hexaaminocobaltică 0,03 N, clorură de amoniu 0,1 N și amoniac 0,1 N. Condițiile de polarografiere au fost următoarele : tensiunea 3,8 V, sensibilitatea galvanometrului 1/50, timp de picurare 2,8 sec., temperatura +20°C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Recent, schimbătorii de ioni celulozici au început să fie introduși și în cercetarea proteinelor musculare [9] [10] [11], oferind noi posibilități de investigație în acest domeniu. Cele cîteva date existente pînă în prezent n-au putut permite deocamdată standardizarea condițiilor de lucru, fracționarea proteinelor musculare pe schimbători de ioni celulozici fiind încă susceptibilă de îmbunătățiri. În ansamblul acestor condiții, un rol determinant revine, printre altele, pH-ului și gradientului de concentrație la care se realizează fracționarea. În acest sens, pentru a stabili influența pH-ului, am efectuat separarea cromatografică a proteinelor musculare sarcoplasmatice la diferite valori de pH, menținînd constantă natura tamponului. Rezultatele obținute ne îndreptățesc să afirmăm că, în condițiile noastre de lucru, pH-ul optim de fracționare, atît în cazul proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul striat cît și din cel neted, este de 7,5—7,6. Efectuarea fracționării acestor proteine la valori de pH mai mari (8,6 și 9,0) a condus la rezultate nesatisfăcătoare, în sensul că nu s-a putut obține o individualizare mai avansată a diferitelor tipuri de proteine. În aceste condiții, aproape întreaga cantitate de proteine introduse în coloană s-a eluat într-o singură fracțiune principală.

Din punctul de vedere al valorii pH-ului la care se efectuează fracționarea, rezultatele noastre sînt diferite de cele prezentate de S. V. Perry și colab. [10] și L. Marcaud [12], care au obținut separări satisfăcătoare la pH-uri mai alcaline. Diferența poate fi atribuită fie naturii tamponului, fie substanței cu care se realizează gradientul de concentrație, fie, în fine, provenienței proteinelor sarcoplasmatice.

Calitatea separării pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul striat și neted este dependentă de valoarea gradientului de concentrație, respectiv de forța ionică cu care se realizează fracționarea. Rezultatele obținute ne indică faptul că eluția practic totală a diferitelor

fracţiuni proteice are loc într-un interval mic al gradientului de concentraţie, şi anume între 0 şi 0,5 M clorură de sodiu. Mărirea bruscă a gra-

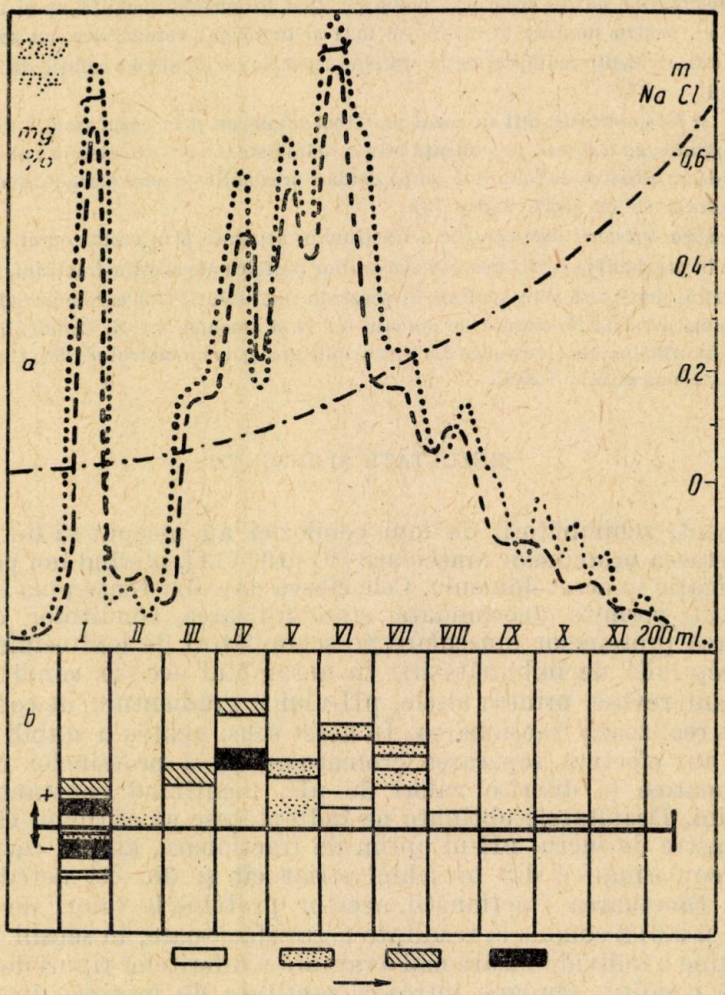


Fig. 1. — *a*) Fracţionarea pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul striat.

– Linia punctată ... determinări spectrofotometrice (280 mμ).
– Linia întreruptă – – – – determinări prin micrometoda Lowry (modificată).
– Linie-punct – . – . – . – . gradientul de concentraţie.

b) Compoziţia electroforetică (gel de amidon) a fracţiunilor separate cromatografic (sensul săgeţii : creşterea intensităţii de culoare a tipurilor de proteine puse în evidenţă cu Amidoschwartz).

dientului de concentraţie după această valoare, ca şi schimbarea pH-ului spre valori mai alcaline, ne-a indicat absenţa unei reţineri de proteină pe coloană, care să nu fi fost anterior eluată. După cum rezultă din fig. 1 a

și 2 a, eluția fracțiunilor majore se produce între 0 și 0,2 M concentrație în clorură de sodiu, în acest interval fiind eluată aproximativ 80% din pro-

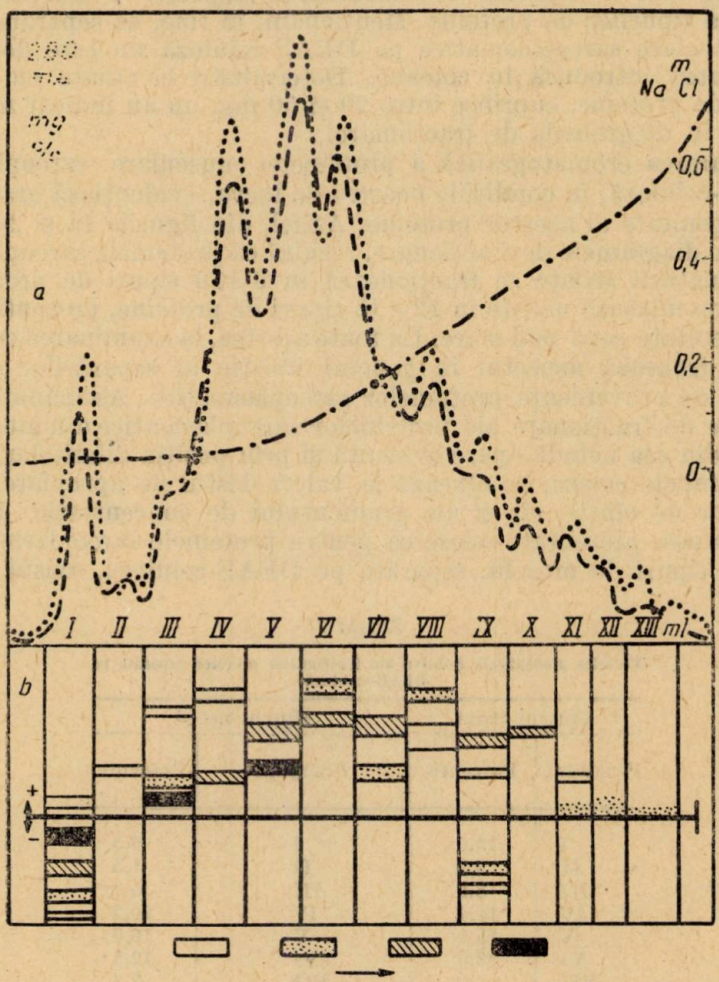


Fig. 2. — *a*) Fracționarea pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul neted.

— Linia punctată .... determinări spectrofotometrice (280 mμ).
— Linia întreruptă – – – – determinări prin micrometoda Lowry (modificată).
— Linie-punct —.—.—.—. gradientul de concentrație.

b) Compoziția electroforetică (gel de amidon) a fracțiunilor separate cromatografic (sensul săgeții : creșterea intensității de culoare a tipurilor de proteine puse în evidență cu Amidoschwartz).

teina totală regăsită după cromatografiere. De aceea, utilizarea inițială a unui gradient de concentrație începînd de la 0,1 M clorură de sodiu nu a determinat o separare corespunzătoare, fracțiunile care se eluează

în jurul acestei valori neindividualizîndu-se, ci apărînd în bloc. Aplicarea unui gradient de concentraţie cuprins între 0 şi 2 M clorură de sodiu a determinat însă o separare satisfăcătoare, respectiv o fracţionare mai avansată a tipurilor de proteine. Menţionăm, în fine, că separarea proteinelor musculare sarcoplasmatice pe DEAE-celuloză nu este dependentă de cantitatea introdusă în coloană. Determinări efectuate cu cantităţi variabile de proteine, cuprinse între 20 şi 50 mg, nu au indicat modificări calitative în diagramele de fracţionare.

Separarea cromatografică a proteinelor musculare sarcoplasmatice pe DEAE-celuloză, în condiţiile noastre de lucru, evidenţiază gradul mare de heterogenitate al acestor proteine. Astfel, din figurile 1a şi 2a, în care sînt redate diagramele de fracţionare, rezultă că proteinele sarcoplasmatice ale musculaturii striate se fracţionează în 9—10 tipuri de proteine, iar cele ale musculaturii netede în 12—13 tipuri de proteine, prezentînd astfel o heterogenitate ceva mai mare. Cu toate acestea, la examinarea celor două diagrame frapează aspectul în general identic al separărilor obţinute, indiferent de proveniența proteinelor sarcoplasmatice. Asemănarea dintre diagramele de fracţionare ale proteinelor sarcoplasmatice din musculatura striată şi din cea netedă apare evidentă şi prin poziţia diferitelor fracţiuni care, în ambele cazuri, se eluează la valori destul de apropiate, atît ale intervalelor de eluţie, cît şi ale gradientului de concentraţie. Totodată, din diagramele prezentate reiese că pentru proteinele sarcoplasmatice din cele două tipuri de muşchi, separate pe DEAE-celuloză, există o supra-

Tabela 1

Valorile procentuale relative ale fracţiunilor proteice separate pe DEAE-celuloză

Muşchi striat		Muşchi neted	
Fracţiuni	Procente	Fracţiuni	Procente
I	19,0	I	6,5
II	3,2	II	1,5
III	8,2	III	5,7
IV	11,4	IV	20,2
V	15,1	V	16,0
VI	23,0	VI	12,8
VII	6,5	VII	8,2
VIII	7,0	VIII	8,0
IX, X	6,6	IX	7,3
		X	5,1
		XI, XII, XIII	8,7

punere a curbelor obţinute prin micrometoda Lowry modificată, cu cele obţinute prin spectrofotometrie la 280 mμ. Unele determinări efectuate şi la 260 mμ au evidenţiat atît pentru proteinele sarcoplasmatice din muşchiul striat cît şi pentru cele din muşchiul neted, în general, acelaşi aspect al separărilor, valorile extincţiilor fiind însă în acest caz mai mari decît cele obţinute la 280 mμ.

Analizînd, în continuare, figurile 1a și 2a, se mai pot evidenția și alte elemente comune care subliniază asemănarea proteinelor sarcoplasmatice din cele două tipuri de mușchi, asemănare reflectată de comportarea lor la fracționare pe DEAE-celuloză. Din tabela 1, în care sînt redate valorile procentuale relative ale diferitelor fracțiuni separate pe coloană, se constată că în ambele cazuri există 4—5 fracțiuni majore în care sînt concentrate, în medie, 60% din proteinele regăsite după cromatografiere; se observă că fracțiunile I, IV, V și VI, atît în cazul proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul striat cît și în cazul celor din mușchiul neted, conțin cea mai mare cantitate de proteine. Ținînd seama de valoarea practic neglijabilă a gradientului de concentrație, precum și de rapiditatea cu care se eluează fracțiunea I, putem trage concluzia că această fracțiune trece nereținută de suportul celulozic. Această comportare comună la ambele tipuri de mușchi relevă natura, respectiv compoziția proteică deosebită a fracțiunii I. Atrage atenția și prezența unor fracțiuni (II, III, VII) care, deși nu sînt net individualizate, apar totuși în mod constant pe diagramele de fracționare ale proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul striat și din cel neted. De asemenea, după ramura descendentă a fracțiunii VI, în porțiunea finală a separării se constată existența unei familii de fracțiuni mai mult sau mai puțin individualizate, care apar și ele în mod constant pe ambele diagrame de fracționare.

Datele prezentate cu privire la fracționarea pe DEAE-celuloză ridică problema stabilirii corespondenței, a comparării naturii și compoziției fracțiunilor care compun proteinele sarcoplasmatice ale celor două tipuri de mușchi. De aceea, pentru caracterizarea diferitelor fracțiuni separate pe DEAE-celuloză și, implicit, a proteinelor sarcoplasmatice în ansamblu, ne-am îndreptat atenția spre analiza lor electroforetică. În acest scop am aplicat, ca variantă principală a metodei, electroforeza în gel de amidon, mediu considerat actualmente ca avînd una dintre cele mai mari capacități de rezoluție.

Electroforeza în gel de amidon confirmă datele obținute prin cromatografia pe DEAE-celuloză în ceea ce privește deosebirea, ca grad de heterogenitate, dintre proteinele sarcoplasmatice din mușchiul striat și acelea din mușchiul neted. Astfel, din figura 3 reiese că proteinele sarcoplasmatice din mușchiul striat se separă în 11—12 tipuri de proteină, iar cele ale mușchiului neted în 13—14 tipuri de proteină. Rezultă deci, întocmai ca și la separarea pe DEAE-celuloză, că proteinele sarcoplasmatice ale mușchiului neted posedă o compoziție mai complexă. La proteinele sarcoplasmatice din ambele tipuri de mușchi majoritatea fracțiunilor electroforetice au sarcini electrice negative, migrînd spre anod (a—i, j); din acest punct de vedere nu există deosebiri semnificative între proteinele mușchiului striat și ale celui neted, decît în ceea ce privește valoarea cantitativă mare a fracțiunilor *c* și *d* din proteinele sarcoplasmatice ale mușchiului striat. Deosebiri notabile se constată însă în numărul și mobilitatea electroforetică a fracțiunilor cu migrare catodică. Proteinele sarcoplasmatice din mușchiul neted posedă un număr mai mare de fracțiuni bine individualizate cu sarcină electropozitivă (h—n) și cu altă mobilitate decît proteinele sarcoplasmatice ale mușchiului striat. Prin electro-

foreza pe hîrtie, proteinele sarcoplasmatice din mușchiul neted se separă în 5—6 fracțiuni, pe cînd cele din mușchiul striat în 4—5 fracțiuni, mai puțin individualizate. Calitatea separării prin electroforeza pe hîrtie diferă la proteinele sarcoplasmatice din cele două tipuri de mușchi, fiind mai puțin satisfăcătoare în cazul proteinelor mușchiului striat, la care se constată și o mobilitate electroforetică mai mică a fracțiunilor.

Electroforeza pe hîrtie a fost totuși utilizată pentru evidențierea și localizarea glico- și lipoproteinelor, atît în cazul proteinelor sarcoplasmatice totale, cît și în cazul diferitelor fracțiuni obținute prin separare pe DEAE-celuloză. Proteinele sarcoplasmatice din mușchiul striat și din cel neted conțin complexe glico- și lipoproteice. Se constată astfel, în ambele cazuri, că componentele glucidice sînt repartizate pe toate fracțiunile proteice care compun spectrul electroforetic. Așadar, tipurile de proteine sarcoplasmatice din mușchii striați și din cei netezi, puse în evidență prin electroforeză pe hîrtie, sînt complexe glicoproteice. La proteinele sarcoplasmatice din mușchiul striat, lipoproteinele sînt localizate aproape exclusiv, sub forma unei pete difuze, în zona fracțiunilor cu mobilitate electroforetică mică, pe cînd la proteinele sarcoplasmatice ale mușchiului neted lipoproteinele se pun în evidență pe majoritatea fracțiunilor care compun spectrul electroforetic. Menționăm faptul că prezența complexelor glico- și lipoproteice a fost semnalată și la majoritatea fracțiunilor separate prin cromatografie pe DEAE-celuloză. Complexele glico- și lipoproteice au fost evidențiate fie după analiza electroforetică a acestor fracțiuni, fie după pipetarea din aceste fracțiuni a unor spoturi pe hîrtie Whatman și colorarea lor ulterioară.

Analiza electroforetică, și în special cea în gel de amidon, indică faptul că fracțiunile separate pe DEAE-celuloză au în general o compoziție diferită (fig. 1b și 2b). Deși aceste fracțiuni nu sînt omogene din punct de vedere electroforetic, se constată totuși că fiecare din ele este reprezentată prin cîte un tip de proteină predominant. O excepție ar constitui-o fracțiunea cromatografică I, care atît la proteinele sarcoplasmatice din mușchiul neted cît și la cele din mușchiul striat conține mai multe tipuri de proteine, puse în evidență prin electroforeză în gel de amidon. Fracțiunea I, care trece practic neadsorbită de coloană, conține, după compoziția sa electroforetică, toate tipurile de proteină cu sarcină electropozitivă. Această constatare apare deosebit de evidentă în cazul proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul neted (fig. 2b); în compoziția fracțiunii I din proteinele sarcoplasmatice ale mușchiului striat se constată însă că alături de tipurile de proteină cu sarcină pozitivă, sînt prezente și unele tipuri cu migrare anodică (fig. 1b). De notat că urme din tipurile de proteină cu sarcină electropozitivă se pun în evidență și în compoziția fracțiunilor cromatografice IX de la mușchiul neted, precum și de la mușchiul striat. Datele furnizate de analiza electroforetică în gel de amidon ne dau așadar posibilitatea interpretării, într-o anumită măsură, a faptului că fracțiunea cromatografică I trece nereținută de coloană. În compoziția acestei fracțiuni intră tipuri de proteină care au sarcini electrice diferite de ale celor adsorbite pe suportul celulozic. Rezultă deci că, în condițiile noastre de pH, coloana nu posedă afinități electrostatice pentru tipurile

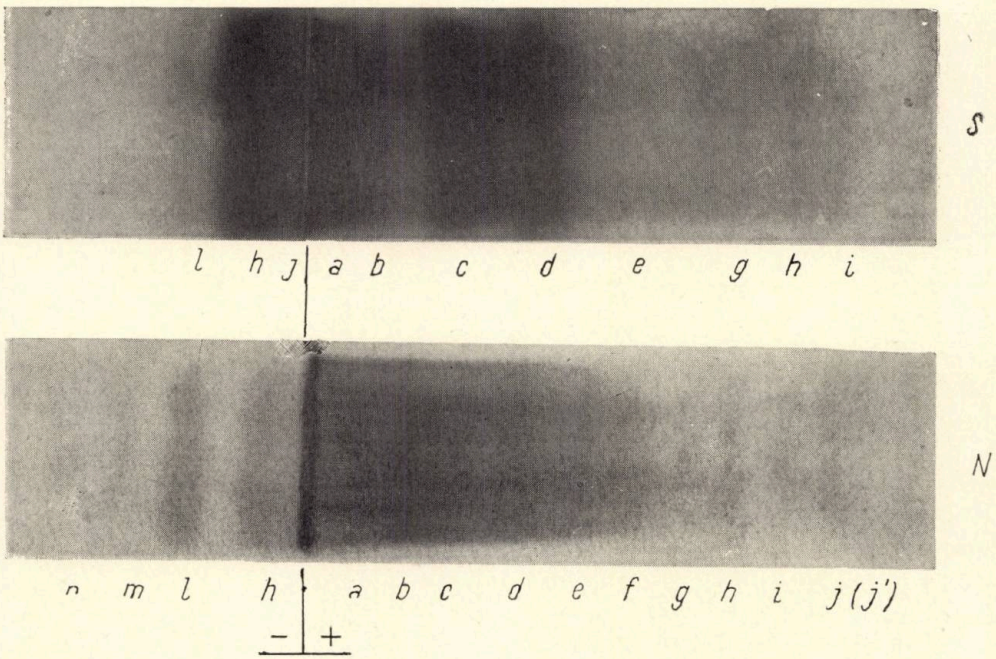


Fig. 3. — Separarea electroforetică în gel de amidon a proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul striat (*S*) și neted (*N*).

de proteină cu anumită încărcare electrică. Cercetarea mai aprofundată a faptului descris constituie una din preocupările noastre actuale.

Din figurile 1b și 2b mai rezultă că în compoziția fracțiunilor cromatografice IV, VI din proteinele sarcoplasmatice ale ambelor feluri de mușchi se găsesc tipurile de proteine cu mobilitatea electroforetică cea mai mare. Referitor la aceasta, menționăm că diferitele tipuri de proteine care compun fracțiunile separate prin cromatografie își schimbă într-o anumită măsură mobilitatea electroforetică, care devine mai mică comparativ cu aceea pe care ele o posedă în ansamblul molecular al proteinei totale. Menționăm, de asemenea, că și prin electroforeză pe hîrtie am pus în evidență compoziția în tipuri de proteine a diferitelor fracțiuni separate cromatografic, eficiența rezultatelor fiind însă în acest caz inferioară celei obținute prin electroforeza în gel de amidon.

În cadrul caracterizării comparative a proteinelor musculare sarcoplasmatice, cercetările noastre au comportat și unele aspecte polarografice.

În acest sens, am pornit de la ideea că unda polarografică proteică și parametrii care o caracterizează pot defini nu numai valoarea cantitativă a reacției catalitice, ci, într-o anumită măsură, și aspectul calitativ al compoziției proteice, al naturii componentelor proteice [13], [14]. De aceea, am considerat necesară cercetarea, respectiv caracterizarea și din punct de vedere polarografic a fracțiunilor proteice separate pe DEAE-celuloză; aceasta, în scopul stabilirii pe de o parte a unor eventuale diferențieri

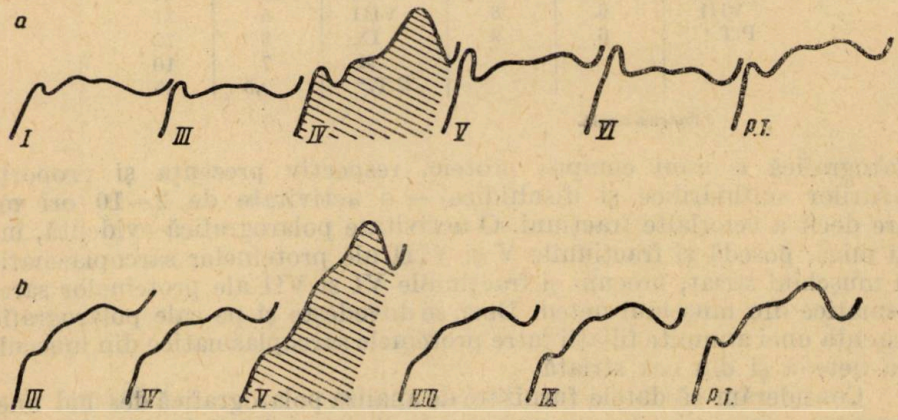


Fig. 4. — Undele polarografice proteice ale diferitelor fracțiuni separate pe DEAE-celuloză.

a) **Proteine sarcoplasmatice din mușchiul striat.** *b)* **Proteine sarcoplasmatice din mușchiul neted.**

între fracțiunile separate cromatografic, iar pe de altă parte a paralelismului de comportare a proteinelor sarcoplasmatice din cele două tipuri de mușchi.

Astfel, rezultatele obținute pe cale polarografică au scos în evidență un fapt interesant, și anume că unele fracțiuni proteice posedă (pentru o aceeași concentrație proteică) o activitate polarografică deosebită, respectiv o proporție mai mare de grupări superficiale sulfhidrilice și disulfidice.

Din figura 4 rezultă că fracţiunea IV a proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul striat, precum şi fracţiunea V a proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul neted, se deosebesc evident, prin activitatea lor polarografică, de celelalte fracţiuni separate cromatografic. Din tabela 2 reiese că fracţiunile IV, respectiv V, prezintă — după valoarea maximului II polarografic (valoare care, spre deosebire de maximul I, reflectă activitatea

Tabela 2

Activitatea polarografică a diferitelor fracţiuni din proteinele musculare sarcoplasmatice, separate pe DEAE-celuloză

Proteine sarcoplasmatice din muşchiul striat. Concentraţie proteică: 7.10^{-5} g/ml			Proteine sarcoplasmatice din muşchiul neted. Concentraţie proteică: $1{,}54.10^{-4}$ g/ml		
Fracţiuni	h_{mm}		Fracţiuni	h_{mm}	
	h_I	h_{II}		h_I	h_{II}
I	4,5	4,5	I	7	11
II	2	2	II	3	4
III	3,5	3,5	III	6	9
IV	6	**19**	IV	7	10
V	4,5	5,5	**V**	17	**30**
VI	3	3,5	VI	13	16,5
VII	3,5	5	VII	13	16
VIII	6	8	VIII	6	11
P.T.*	6	9	IX	8	12
			X	7	10
			P.T.*	9,5	15

* Proteină totală.

polarografică a unui compus proteic, respectiv prezenţa şi proporţia grupărilor sulfhidrilice şi disulfidice) — o activitate de 2—10 ori mai mare decît a celorlalte fracţiuni. O activitate polarografică evidentă, însă mai mică, posedă şi fracţiunile V şi VIII ale proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul striat, precum şi fracţiunile VI şi VII ale proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul neted. Deci, se dovedeşte şi pe cale polarografică existenţa unei anumite filiaţii între proteinele sarcoplasmatice din musculatura netedă şi din cea striată.

Considerăm că datele furnizate de analiza polarografică deschid unele perspective cu privire la cercetarea naturii şi activităţii fracţiunilor separate pe DEAE-celuloză, care prezintă o polaroactivitate deosebită. Nu este exclus ca în aceste fracţiuni să fie localizate enzime cu un anumit conţinut în grupări sulfhidrilice, după cum nu este exclus ca aceste fracţiuni să posede o anumită arhitectură structurală, care să le confere o activitate polarografică mai mare. Este semnificativ şi faptul că această comportare deosebită nu se manifestă în cadrul ansamblului tuturor fracţiunilor care compun aşa-zisa proteină totală, ci numai în condiţiile unei simplificări a compoziţiei acestui ansamblu, prin îndepărtarea la separarea cromatografică a fracţiunilor inactive polarografic. Într-adevăr, activitatea polarografică a proteinei totale este mai scăzută, aproximativ

la jumătate, comparativ cu activitatea polarografică a fracțiunilor IV, respectiv V (tabela 2).

Se poate deci presupune că aceste fracțiuni active s-ar găsit într-o anumită interacțiune cu celelalte fracțiuni, în cadrul ansamblului molecular proteic, ceea ce ar putea determina mascarea parțială a grupărilor sulfhidrilice de la suprafața moleculelor proteice.

CONCLUZII

a) Proteinele sarcoplasmatice din mușchiul striat și din cel neted de broască prezintă un grad mare de heterogenitate, reflectat prin fracționarea pe DEAE-celuloză și prin electroforeza în gel de amidon.

b) Deși proteinele sarcoplasmatice ale mușchiului neted sînt ceva mai complexe în privința numărului de tipuri de proteine decît cele ale mușchiului striat, se constată totuși un anumit paralelism, o asemănare de comportare între aceste proteine.

c) Complexitatea proteinelor musculare sarcoplasmatice din ambele tipuri de mușchi se evidențiază și prin prezența în compoziția lor a glico- și lipoproteinelor.

d) Fracțiunea nereținută de coloană (I), care este comună proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul striat și din cel neted, este eterogenă și conține tipurile de proteine cu sarcină electropozitivă.

e) Polarografic se identifică, în ambele cazuri, cîte o fracțiune cu activitate de 2—10 ori mai mare decît a celorlalte fracțiuni separate cromatografic. Activitatea polarografică deosebită se manifestă după individualizarea acestor fracțiuni din ansamblul molecular proteic, proteina totală prezentînd o polaroactivitate mai mică.

f) Deși mușchiul neted este considerat ca fiind mai primitiv din punct de vedere evolutiv, se constată totuși că proteinele sale sarcoplasmatice reflectă un grad de eterogenitate asemănător dacă nu mai mare decît al acelorași proteine din mușchiul striat. Luînd în considerare acest fapt și judecîndu-l prin prisma unor asemănări dintre proteinele sarcoplasmatice din ambele tipuri de mușchi, am ajunge, printre altele, la părerea că specializarea funcțională — *stricto sensu* — n-ar presupune o modificare marcantă la nivelul proteinelor sarcoplasmatice în funcție de această specializare (care, prin specificul ei, este diferită la cele două tipuri de mușchi). Din contră, bazîndu-ne pe natura enzimatică majoritară a proteinelor sarcoplasmatice, trăsătura lor comună apare explicabilă, dat fiind rolul acestor proteine de componente ale sistemului glicolitic implicat în activitatea musculară, indiferent de specificul ei.

Aceste considerații, cu tot caracterul lor de probabilitate, rămîn valabile numai în ipoteza în care, pentru condiții identice de extracție (pH, forță ionică), proteinele sarcoplasmatice din musculatura striată și din cea netedă se obțin ca entități a căror cercetare nu este esențial stînjenită de prezența altor componente proteice care s-ar extrage preferențial numai în cazul unui anumit tip de mușchi [15].

În orice caz, din datele noastre prealabile reiese că există o trăsătură generală comună care caracterizează proteinele sarcoplasmatice din mușchiul striat și din cel neted, trăsătură reflectată atît printr-o compoziție proteică, cît și printr-un ansamblu de proprietăți fizico-chimice în general asemănătoare.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

Prezentată la redacție la 15 iulie 1963

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕИНОВ САРКОПЛАЗМЫ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ И ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ

РЕЗЮМЕ

Авторы, на основании новейших физикохимических критериев, подвергли сравнительному исследованию протеины саркоплазмы поперечнополосатой и гладкой мускулатуры. В этих протеинах они установили высокую степень гетерогенности, что проявляется как путем фракционирования на ДЕАЕ-целлюлозе, так и путем электрофореза на крахмальном теле. Несмотря на то, что протеины саркоплазмы гладких мышц являются более комплексными с точки зрения числа типов протеинов по сравнению с протеинами поперечнополосатых мышц, все же наблюдается некоторый параллелизм, а также и сходство в поведении этих протеинов.

Комплексность протеинов саркоплазмы проявляется в обоих типах мышц также и присутствием в их составе глико- и липопротеинов. При полярографическом исследовании в обоих случаях обнаруживается фракция, обладающая в 2—10 раз большей активностью, чем остальные отделенные хроматографические фракции. Особая полярографическая активность обнаруживается после отделения этих фракций из совокупности протеиновых молекул, причем общий протеин обладает меньшей поляроактивностью. Авторы, на основании полученных результатов, обсуждают аспекты, которые характеризуют общие признаки протеинов саркоплазмы поперечнополосатой и гладкой мускулатуры.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — а) Фракционирование на ДЕАЕ-целлюлозе протеинов саркоплазмы поперечнополосатой мышцы.

. . . . . спектрофотометрические определения (280 мμ)
— — — — — определение при помощи микрометода Лоури (измененного)
—.—.—.—.— градиент концентрации;

b) Электрофоретический состав (крахмальный гель) хроматографически отделенных фракций (направление стрелки: повышенная интенсивность окраски типов отделенных протеинов).

Рис. 2. — a) Фракционирование на ДЕАЕ-целлюлозе протеинов саркоплазмы гладкой мышцы.

. . . . . спектрофотометрические определения (280 mμ)

— — — — — определения при помощи микрометода Лоури (измененного)

—.—.—.—.— градиент концентрации;

b) Электрофоретический состав (крахмальный гель) хроматографически отделенных фракций (направление стрелки: повышенная интенсивность окраски типов отделенных протеинов).

Рис. 3. — Электрофоретическое отделение при помощи крахмального геля протеинов саркоплазмы поперечнополосатой (S) и гладкой (N) мышцы.

Рис. 4. — Протеиновые полярографические волны различных фракций, отделенных на ДЕАЕ -целлюлозе.

a) протеины саркоплазмы поперечнополосатой мышцы; b) протеины саркоплазмы гладкой мышцы.

ÉTUDE COMPARÉE DES PROTÉINES SARCOPLASMATIQUES DES MUSCULATURES STRIÉE ET LISSE

RÉSUMÉ

Les auteurs étudient et comparent, en vertu de critériums physico-chimiques modernes, les protéines sarcoplasmatiques des musculatures striée et lisse. Ces protéines présentent un haut degré d'hétérogénéité, mis en évidence tant par le fractionnement sur DEAE-cellulose que par l'électrophorèse dans du gel d'amidon. Bien que les protéines sarcoplasmatiques du muscle lisse soient un peu plus complexes en ce qui concerne le nombre des types de protéines que celles du muscle strié, il subsiste quand même un certain parallélisme, une ressemblance du comportement, entre ces deux groupes. La complexité des protéines sarcoplasmatiques des deux sortes de muscles est démontrée aussi par la présence dans leur composition des glycoprotéines et des lipoprotéines. Par la polarographie on peut identifier dans les deux cas une fraction à activité 2 à 10 fois plus grande que celle des autres fractions séparées par la chromatographie. Cette activité polarographique toute particulière devient manifeste après individualisation de ces fractions de l'ensemble moléculaire protéique, la protéine totale présentant une activité polarographique moindre. En vertu des résultats obtenus, les auteurs discutent les aspects qui caractérisent le trait général commun aux protéines sarcoplasmatiques du muscle lisse et du muscle strié.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — En *a* : fractionnement sur DEAE-cellulose des protéines sarcoplasmatiques du muscle strié.

En pointillé.... : déterminations spectrophotométriques (280 mμ) ; tirets — — — — : déterminations par la microméthode de Lowry (modifiée) ; tirets et points —.—.—.—. : gradient de concentration.

En *b*: composition électrophorétique (dans de l'amidon gélifié) des fractions séparées chromatographiquement (direction de la flèche: croissance de l'intensité de la couleur des types de protéines séparées).

Fig. 2. — En *a*: fractionnement sur DEAE-cellulose des protéines sarcoplasmatiques du muscle lisse. En pointillé .... : déterminations spectrophotométriques (280 mμ); tirets — — — —: déterminations par la microméthode de Lowry (modifiée); tirets et points —.—.—.—.; gradient de concentration.

En *b*: composition électrophorétique (dans de l'amidone gélifié) des fractions séparées par la chromatographie (direction de la flèche: intensification de la couleur des types de protéines séparées).

Fig. 3. — Séparation électrophorétique dans de l'amidon gélifié des protéines sarcoplasmatiques du muscle strié (*S*) et lisse (*N*).

Fig. 4. — Ondes polarographiques protéiques des diverses fractions séparées sur DEAE-cellulose. *a*) Protéines sarcoplasmatiques du muscle strié; *b*) protéines sarcoplasmatiques du muscle lisse.

BIBLIOGRAFIE

1. S. V. PERRY, Ann. rev. biochem., **30**, 473 (1961).
2. A. G. SZENT-GYÖRGYI, în „*The structure and function of muscle*", Academic Press Inc., New York, vol. II, 2, 1960.
3. R. CZOK, TH. BÜCHER, *Advances in protein chemistry*, **15**, 316 (1960).
4. G. L. MILLER, Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
5. M. ŞERBAN, D. TĂNĂSESCU, S. VASU, St. cercet. biochimie, **VI**, *1*, 115 (1963).
6. O. SMITHIES, Biochem. J., **61**, 629 (1955).
7. E. BENHAMOU, J. PUGLIÉSE, J. CHICHE, F. AURONCHE, Presse Méd., **62**, 651 (1954).
8. I. SMITH, *Cromatographic and Electrophoretic Techniques*, **II**, 16 (1962).
9. S. V. PERRY, M. ZYDOWO, Biochem. J., **71**, 220 (1959).
10. D. J. HARTSHORNE, S. V. PERRY, Biochem. J., **85**, 171 (1962).
11. H. TSUYUKI, E. ROBERTS, R. E. A. GODD, Canad. J. Biochem. a. Physiol., **40**, 919 (1962).
12. L. MERCAUD, *Abstr. V-th Int. Congr. Biochem.*, Moscow, 1961, S 10, 201.
13. M. ŞERBAN, St. cercet. biochimie, **IV**, *1*, 112 (1961).
14. M. ŞERBAN, St. cercet. biochimie, **VI**, *3*, 383 (1963).
15. И. И. ИВАНОВ, Х. И. МИРОВИЧ, з Х. ЖАХОВА и С.Ч. ТУКАЧИНСКИЙ, Биохимия, 27, 1, 94 (1962).

INFLUENȚA PIRIDOXALULUI ASUPRA ACTIVĂRII TRANSAMINAZEI MITOCONDRIALE HEPATICE

DE

C. VILĂU și MARIA TETEA

Cercetări asupra *L*-glutamat-oxalacetat-transaminazei au demonstrat că forma ei stabilă este aceea în care apoenzima este legată de piridoxal-fosfat.

Prin purificarea enzimei și examinare electroforetică s-a evidențiat în ficat existența a două enzime, numite A și B [1], caracterizate prin mobilitate electroforetică, afinitate față de substrat și dependență de pH, diferite.

Boyd [2] stabilește identitatea acestor două fracțiuni electroforetice cu enzima din mitocondrii pentru A și din supernatant pentru B.

În scopul de a elucida conținutul real în enzimă și pentru a preciza corelația cu celelalte sisteme enzimatice din mitocondrii, s-au efectuat o serie de studii asupra creșterii activității transaminazei mitocondriale, cînd aceasta a fost eliberată din mitocondrii, cu ajutorul diferiților agenți fizici și chimici [2—4].

În literatură există indicații că șobolanii, în timpul înfometării, în afară de pierderea greutății corporale prezintă și o scădere în activitatea unor enzime [5—7].

În lucrarea de față am căutat să vedem dacă studiul cinetic al activității transaminazice din mitocondriile întregi și tratate cu dezoxicolat de sodiu poate da indicații în această direcție.

MATERIAL ȘI METODĂ

Șobolani Wistar în greutate de 190±20 g au fost hrăniți timp de 6 zile cu o dietă sintetică, pentru echilibrare. Hrana era constituită din : amidon 630 g, cazeină 120 g, amestec de săruri Mendel-Osborne 40 g, agar pulbere 20 g, drojdie de bere 40 g și ulei de porumb 80 g. Dieta a fost suplimentată cu un amestec de riboflavină 1 mg, piridoxină 2,5 g, tiamină 3 mg, pantotenat de calciu 7 mg și colină 300 mg. Animalele primeau zilnic 15 g de hrană, iar

apa a fost consumată *ad libitum*. După o perioadă de 6 zile, animalele socotite normale au fost sacrificate prin decapitare. Mitocondriile au fost separate prin procedeul următor : ficatul era tăiat în fragmente şi spălat cu o soluţie rece de manitol 0,25 M. Omogenizarea s-a efectuat într-un poter de sticlă, reluîndu-se de două ori sedimentul, iar raportul dintre soluţia de manitol şi ficat era de 2,5, 1,5 şi 1 v/v. După fiecare omogenizare, se centrifuga la 600 × g, iar sedimentul se relua cu manitol în raportul de volum amintit. După cele trei centrifugări, supernatantele au fost reunite şi centrifugate încă o dată la 600 × g, pentru a îndepărta restul de nuclei. Mitocondriile au fost sedimentate timp de 15 minute la 10 000 × g, apoi suspendate şi centrifugate de încă două ori.

Pentru determinarea activităţii enzimatice s-a folosit tehnica lui Cammarata şi Cohen [8], modificată de Boyd [2].

Variaţiile de extincţie au fost urmărite timp de 5 minute la 25°C ± 0,2 cu un spectrofotometru Zeiss V.S.U., la care s-a adaptat un dispozitiv de termostatare cu termometru de control. Determinările s-au efectuat atît pe mitocondrii intacte, cît şi tratate cu dezoxicolat de sodiu, în concentraţie finală de 0,15 şi 1,5 %.

Un alt lot de animale, după perioada de echilibrare a fost supus înfometării pentru intervale 48—96 de ore, iar activitatea transaminazică a fost determinată ca şi la lotul martor. În această perioadă, animalele au primit numai apă. Un al treilea lot de animale a fost ţinut fără hrană numai 48 de ore, primind în primele 24 de ore apă, iar în următoarele o soluţie tampon fosfat 10^{-4} M în volum de 15 ml, la care s-a adăugat 30 μM clorhidrat de piridoxal.

Ca reactivi au fost folosiţi : acid aspartic (NBC), clorhidrat de piridoxal (NBC), fosfat primar şi secundar de potasiu (Serva), acid α-cetoglutaric (Fluka), acid oxalacetic (NBC) şi dezoxicolat de sodiu (BDH); nu au fost purificaţi. Manitolul (Chemapol) a fost purificat în prealabil cu cărbune animal şi precipitat cu alcool.

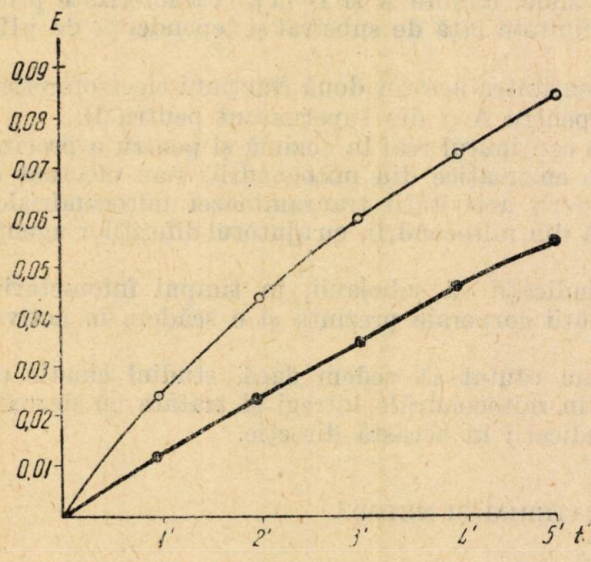


Fig. 1.—Variaţia activităţii transaminazice pe mitocondrii intacte şi sparte cu dezoxicolat de sodiu, la şobolanii normali.
●—● mitocondrii intacte ○—○ mitocondrii sparte
E = extincţia; t' = timp în minute

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În figura 1 este reprezentată variaţia activităţii *L*-glutamat-oxalacetat transaminazei din mitocondriile intacte şi tratate cu dezoxicolat de sodiu, la şobolani normali. Tratarea mitocondriilor cu dezoxicolat a produs o creştere foarte accentuată a activităţii transaminazice, fără ca aceasta să fie afectată de concentraţia detergentului. În schimb, la mitocondriile sparte cu de-

zoxicolat se constată o scădere mult mai accentuată a vitezei de reacție, din cauza inhibiției provocate de acumularea oxalacetatului în mediul reacțional, așa cum a arătat și Boyd [2]. Calculele arată o scădere a vitezei de reacție cu 32% în timp de 5 min. pentru mitocondriile intacte, cînd concentrația oxalacetatului crește cu 0,65 μM în mediul reacțional. Pentru mitocondriile sparte, viteza de reacție scade pentru același interval de timp cu 50%, iar concentrația oxalacetatului ajunge la 0,85 μM. Din cauza acestui fapt, pentru determinarea creșterii activității enzimatice am folosit raportul dintre vitezele de reacție cu valoare maximă, care sînt de fapt viteze inițiale.

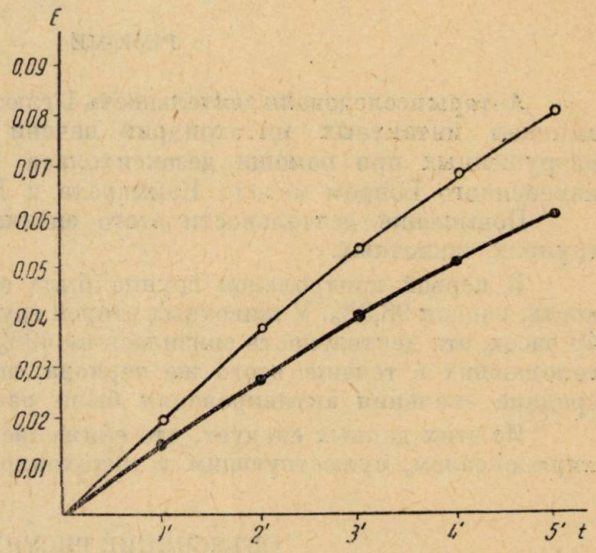


Fig. 2. — Variația activității transaminazice pe mitocondrii intacte și sparte cu dezoxicolat de sodiu, la șobolanii înfometați.

În figura 2, este reprezentată perechea de curbe de activitate transaminazică pentru șobolanii supuși la înfometare. După cum reiese din grafic, discrepanța între curbe este mult mai mică și diferența între vitezele inițiale minimă. Administrarea de piridoxal animalelor înfometate produce o diferențiere mult mai mare a activităților, întrecînd chiar valoarea medie a lotului martor. Dăm mai jos valorile medii ale activărilor obținute pe cele 3 loturi de șobolani.

	Activare %
Șobolani normali	96,3
„ înfometați	49,0
„ „ + piridoxal	106,0

Valorile reprezintă media a 4 determinări pentru fiecare lot. Deși scăderea în greutate a animalelor înfometate a fost de circa 5% din greutatea corporală pentru fiecare 24 de ore, în schimb scăderea activării nu a fost accentuată semnificativ la animalele cu un timp de înfometare mai îndelungat. Totuși, scăderea în greutate a animalelor care au primit piridoxal nu a afectat cu nimic activarea transaminazei mitocondriale.

Rezultatele prezentate par a arăta că scăderea activării transaminazice în urma înfometării se datorește de fapt pierderii de cofactor.

Facultatea de medicină generală, București,
Catedra de biofizică

Prezentată la redacție la 17 mai 1963

ВЛИЯНИЕ ПИРИДОКСАЛА НА ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ

РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали деятельность 1-глютамата-оксалацетата трансаминазы интактных митохондрий печени и митохондрий печени, разрушенных при помощи дезоксихолата натрия, с использованием измененного Бойдом метода Каммарата и Когена.

Повышение деятельности этого энзима было установлено на 3 группах животных.

В первой контрольной группе была отмечена средняя деятельность, равная 96,3%. У животных второй группы, голодавших в течение 48 часов, эта деятельность снизилась на 49%. У животных 3-й группы, голодавших в течение этого же периода, но получавших пиридоксал, средние значения активирования были равны 106%.

Из этих данных следует, что снижение деятельности обусловлено пиридоксалом, существующим в митохондриях.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение деятельности трансминазы в интактных митохондриях и митохондриях, разрушенных дезоксихолатом натрия у нормальных крыс.

●—● = интактные митохондрии

○—○ = разрушенные митохондрии

E = экстинкция; t′ = время в минутах

Рис. 2. — Изменение деятельности трансминазы в интактных митохондриях и митохондриях, разрушенных дезоксихолатом натрия, у голодавших крыс.

INFLUENCE DU PYRIDOXAL SUR L'ACTIVATION DE LA TRANSAMINASE MITOCHONDRIALE HÉPATIQUE

RÉSUMÉ

On a étudié l'activité de la L-glutamate-oxalacétate-transaminase des mitochondries hépatiques intactes et crevées au désoxycholate de sodium, par application de la méthode de Cammarata et Cohen, modifiée par Boyd.

On a calculé l'accroissement de l'activité enzymatique chez trois groupes d'animaux.

Le premier groupe, utilisé comme témoin, a présenté une activation de 96,3%, en moyenne. Chez un deuxième groupe, soumis au jeûne pendant 48 heures, l'activation est tombée à 49%. Dans le troisième groupe, soumis

au jeûne pendant la même période mais ayant reçu du pyridoxal, la valeur moyenne de l'activation était de 106%.

Des données présentées par l'auteur il ressort que la diminution de l'activation est en rapport avec la quantité de pyridoxal se trouvant dans les mitochondries.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation de l'activité transaminasique des mitochondries intactes et de celles crevées au désoxycholate de sodium chez les rats normaux. ●—● Mitochondries intactes; ○—○ mitochondries crevées; E = extinction; t' = minutes.

Fig. 2. — Variation de l'activité transaminasique des mitochondries intactes ou crevées chez les rats affamés.

BIBLIOGRAFIE

1. FLEISHER G. A., POTTER G. S., WAKIM K. G., PANKOW M., OSBORNE D., Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., **103**, 229 (1960).
2. BOYD Y. W., Biochem J., **81**, 434 (1961).
3. GAULL G., VILLEE C. A., Biochim. Biophys. Acta, **39**, 560 (1960).
4. BORST P., Biochim, Biophys. Acta, **57**, 256 (1962).
5. SOBEROM G., SANCHEZ E., J. biol. chem., **236**, 1602 (1961).
6. EISENSTEIN J., Biochim. Biopyhs. Acta, **62**, 411 (1962).
7. NIEMEIYER H., PEREZ N., GARCES E., VERGARA T. E., Biochim. Biophys. Acta, **62**, 411 (1962).
8. CAMMARATA P. S., COHEN P. P., J. biol. Chem., **193**, 63 (1951).

EXTRAGEREA UNUI PREPARAT DE ADN DIN CANTITĂȚI REDUSE DE EMBRIONI DE GRÎU

DE

MARGARETA ELIAS

În metodele curente de extracție a ADN din material vegetal se folosesc ca materie primă embrionii de grîu proveniți de la întreprinderi posesoare de degerminatoare speciale. Accesibilitatea în cantități mari a embrionilor pe această cale a dus la elaborarea unor metode de extragere a ADN care folosesc ca material inițial 200—300 g embrioni [1], [2].

În cercetările noastre, s-a ivit necesitatea obținerii unor preparate de ADN din embrioni de grîu cu specificitate strictă de soi. De aceea, ne-am propus obținerea în laborator a acestor embrioni din cantități de circa 20 g și adaptarea tehnicilor clasice de extracție a ADN la această cantitate redusă.

Obținerea embrionilor. Boabele de grîu au fost mai întîi ținute 48 de ore într-o atmosferă umedă, timp în care ele au absorbit apă, embrionii devenind astfel mai puțin friabili. După aceea boabele au fost trecute printr-o rîșniță cu valțuri, astfel că endospermul a fost sfărîmat, iar o parte importantă din embrioni au rămas întregi. Boabele sfărîmate au fost trecute succesiv prin două site cu orificii de 1 mm, respectiv 0,63 mm, păstrîndu-se exclusiv fracțiunea rămasă pe ultima sită care este cea mai bogată în embrioni. Aceștia se alegeau apoi cu penseta.

Obținerea preparatului de ADN. Modificările aduse metodelor clasice, de extracție a ADN în vederea adaptării lor la cantități mici de embrioni de grîu au avut drept scop o protecție mai atentă a materialului în cursul extracției sale, avînd în vedere marea sa sensibilitate la diferiți agenți fizico-chimici. Exigența mare în privința purității preparatului impune, în metodele clasice, un număr mare de operații care duc la depolimerizarea parțială a lui, așa încît final se obține, dintr-o cantitate dată de embrioni,

o cantitate de ADN cu mult mai mică decît cea care s-ar obține dacă depolimerizarea n-ar avea loc. Măsuri de protecție :

1. Simplificarea metodei de lucru, prin eliminarea unei serii de operații de dizolvare și reprecipitare, recomandate în metodele uzuale. Prin aceasta, gradul de puritate al preparatului s-a redus într-o oarecare măsură, însă preparatul de ADN obținut este fibrilar, ceea ce indică un grad mare de polimerizare.

2. Efectuarea tuturor operațiilor de extracție în aceeași zi, fără întrerupere pentru a limita acțiunea enzimelor depolimerizante.

3. Controlul pH-ului soluțiilor de extracție pentru menținerea lor la o valoare aproximativ egală cu 7. Această măsură are în vedere împiedicarea depolimerizării preparatului atît prin însăși acțiunea pH-urilor nefavorabile, cît și prin inactivarea nucleazelor tisulare [4]. Acest control riguros al pH-ului ne-a permis eliminarea adaosului de citrat (care se adaugă în metodele clasice în scopul inhibării ADN-azei), cu atît mai mult cu cît există cercetări care arată că citratul nu împiedică decît acțiunea ADN-azei pancreatice [4].

4. În locul precipitării preparatului prin diluție cu apă, sau prin dializă, am întrebuințat precipitarea lui cu ajutorul alcoolului din soluții de NaCl 10%. Acest procedeu este folosit în alte metode pentru precipitarea ADN-ului din alte materiale, și are la bază constatarea că, adăugînd alcool sau acetonă la o soluție salină concentrată de nucleoproteină (în care aceasta este puternic disociată), cea mai mare parte a proteinei rămîne în soluție în timp ce acidul nucleic precipită parțial deproteinizat [4].

5. Distrugerea și omogenizarea țesuturilor embrionului prin simplă mojarare și nu prin folosirea mixerelor, care prin acțiunea lor energică depolimerizează preparatele de ADN prin ruperea lor.

6. Deproteinizarea cu ajutorul detergenților anionici [6] și nu cu ajutorul amestecului de cloroform-alcool superior, care în cazul cantităților mici de embrioni s-a dovedit a fi un procedeu nefavorabil.

Tehnica de lucru a fost următoarea : într-un cilindru de 500 ml, cu dop șlefuit, s-au pus 20 g de embrioni de grîu și 500 ml eter de petrol. Cilindrul s-a fixat într-un agitator rotativ, care s-a lăsat să funcționeze timp de 16 ore, pînă ce s-au îndepărtat substanțele grase din embrioni. Apoi eterul de petrol s-a decantat și embrionii s-au lăsat să se usuce. Operațiile următoare s-au efectuat la temperaturi scăzute, în soluții răcite în prealabil la + 5°C și aduse la pH 7. După uscare, embrionii s-au mojarat cu o soluție 0,14 M de NaCl, pînă s-a obținut o pastă omogenă care s-a completat la 150 ml cu aceeași soluție și apoi s-a centrifugat. Operația s-a repetat de două ori. Pentru extragerea dezoxiribonucleoproteinelor s-au turnat, peste sedimentul obținut, 100 ml soluție M de NaCl. Amestecul s-a turnat într-un pahar Berzelius și s-a agitat timp de 10 minute cu un agitator vertical. Soluția vîscoasă obținută s-a centrifugat și s-a filtrat prin vată, pentru îndepărtarea resturilor celulare rămase în supernatant. S-a obținut astfel o soluție opalescentă care s-a adus la concentrația 2 M prin adaos de clorură de sodiu solidă. Această soluție s-a turnat într-un vas de sticlă cu diametrul mare, peste 1,5 volume alcool absolut (pentru obținerea unui randament mare este importantă turnarea soluției nucleoproteice

peste alcool și nu invers) obținîndu-se un precipitat mucilaginos care s-a cules cu ajutorul unei baghete de sticlă. Pentru îndepărtarea resturilor de alcool precipitatul s-a presat între 2 bucăți de hîrtie de filtru. Acest precipitat este intens pozitiv la reactivul cu difenilamină.

Pentru îndepărtarea proteinelor, cele mai bune rezultate le-am obținut prin metoda recomandată de Chargaff [2], în care se folosește dodecil sulfatul de sodiu și care s-a aplicat de 2 ori succesiv.

Aprecierea conținutului de ADN s-a efectuat după mineralizarea preparatului după metoda lui Shafibekova [7] prin dozarea fosforului total pe cale colorimetrică, folosindu-se reactivul cu vanadat-molibdat, recomandat de Gericke [5]. Cantitatea de fosfor din preparatul nostru a fost de 7,2%, ceea ce corespunde unui conținut de aproximativ 72% ADN.

Preparatul a fost păstrat dizolvat, la temperatura de 5°C, iar ca solvent s-a folosit o soluție de clorură de sodiu 2 M, cu pH 7.

Prezentată la redacție la 22 mai 1963

Institutul de biologie al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. BELOZERSKI A. N., I. N. PROSCURIACOV, *Practiceskoe rukovodstvo po biochimii rastenii*, Moscova, Gos-izd. Nauka, 1951, p. 215.
2. CHARGAFF E., J. N. DAVIDSON, *The nucleic acids, chemistry and biology*, vol. 1, Academic Press, New York, 1955.
3. DALY M. M., V. G. ALFREY, A. E. MIRSKI, *Purine and pyrimidine content of some desoxypentose nucleic acids*, J. Gen. Physiol., **33**, 5–6 (1950).
4. DAVIDSON P. T., B. E. CONWAY, J. A. V. BUTLER, *The nucleoprotein complex of the cell nucleus and his reactions*, în *Progress in biophysics and biophysical chemistry*, Pergamon Press, Londra, 1954, p. 195.
5. GERICKE S., B. KURMIES, *Kolorimetrische Bestimmung der Phosphorsaüre mit Vanadat Molibdat*, Z. anal. chem., **137**, 1522 (1952–1953).
6. LIPSHITZ R., E. CHARGAFF, *Wheat germ DNP extraction and DNA fractionation*, Biochim. Biophys. Acta, **19**, 256 (1956).
7. SHAFIBEKOVA A., Z. SKHARUPA, *Rapid method for determination of phosphoric acid in plant material*, C.A., 4410 (1959).
8. ZAMENHOF S., *Biology and biophisical proprietees of transforming principles*, *in Progress in biophysics and biophysical chemistry*, Pergamon Press, Londra, 1956, p. 85.

ŞEDINŢELE SECŢIEI DE BIOCHIMIE MEDICALĂ A SOCIETĂŢII DE FIZIOLOGIE A UNIUNII SOCIETĂŢILOR DE ŞTIINŢE MEDICALE

În ziua de 27 mai 1963 a avut loc, la sediul Uniunii Societăţilor de Ştiinţe Medicale, şedinţa prezidată de acad. prof. dr. Eugen Macovschi, cu următoarea ordine de zi:

1. *E. Soru, Fl. Ionescu-Stoian* (Inst. „dr. I. Cantacuzino" — Secţia de biochimie generală şi imunochimie): „Contribuţii la studiul chimic al hialuronidazelor".

   Studiul chimic al hialuronidazei testiculare, obţinută sub formă de un înalt grad de puritate, prin cromatografia pe coloană de DEAE-Sephadex (A-50 medium), arată absenţa glucidelor şi a nucleotidelor din molecula acesteia. Enzima este o proteină pură. Studiul aminoacizilor arată absenţa triptofanului, hidroxiprolinei şi aminoacizilor butirici. Determinarea aminoacizilor prin cromatografie pe coloană (Amberlit C. G. 120) permite a-i da următoarea structură empirică: Asp_7, Glu_8, Pro_7, Ser_{13}, Thr_6, Gly_4, Ala_{12}, Val_8, Leu_3, $Ileu_6$, Thr_1, Phe_3, $CySH_3$, His_3, Lys_{10}, Arg_9, Met_5, calculată pe baza greutăţii moleculare medii de 14.714.
2. *M. Zamfirescu-Gheorghiu, C. Vlădescu, I. Apostolescu, C. Miron, M. Gociu* (Inst. de medicină internă al Academiei R.P.R. şi M.S.P.S.): „Cuprioxidaza serică în cursul unor afecţiuni cronice inflamatorii şi al unor hemopatii maligne". Lucrarea se va publica în nr. 1/1964 al revistei.
3. *A. Marx, L. Mesrobeanu* (Inst. „dr. I. Cantacuzino", Secţia de fiziologie microbiană): „Studiul compoziţiei în aminoacizi a endotoxinelor termostabile şi termolabile la bacilul *S. typhimurium*".

   Concepţia generală că endotoxina „O" lipopolizaharidică termostabilă ar fi singurul component al *Enterobacteriaceae*-lor care induce starea toxică, caracteristică infecţiilor Gram-negative, a fost revizuită de către Mesrobeanu şi colab. în 1961. Astfel, autorii au demonstrat prezenţa de lipoproteine toxice termolabile (neurotoxine) la o serie de germeni Gram-negativi. Studiul neurotoxinelor extrase din *S. typhimurium* a relevat existenţa unei înrudiri serologice între neurotoxina „S" şi endotoxina „O", în sensul că neurotoxina reprezintă fracţiunea lipoproteică a endotoxinei glucido-lipido-polipeptidică. Neurotoxinele „R" şi „S" au fost găsite însă diferite din punct de vedere serologic. Pentru lămurirea acestei comportări diferite, autorii şi-au propus studiul compoziţiei în aminoacizi la cele trei toxine. S-a folosit metoda cromatografică

pe rășini schimbătoare de ioni, după Moore și Stein. Din rezultatele obținute, reiese că aminoacizii sînt repartizați în mod similar la cele două neurotoxine lipoproteice „S" și „R" cu toată diferența lor serologică. Endotoxina „O" însă a dat un spectru diferit de aminoacizi față de neurotoxina „S", deși din punct de vedere serologic ele sînt înrudite.

4. *D. Stavri, J. Bittner, V. Voinescu, A. Marx* (Inst. „dr. I. Canatacuzino" Secția de fiziologie microbiană) : „Studiul compoziției chimice a variantei L de *Clostridium perfringens*".

Izolarea pentru prima dată a unei tulpini penicilino-rezistente de *Clostridium perfringens* a ridicat problema studiului ei, atît din punct de vedere morfologic și biologic, cît și din punct de vedere chimic. Studiul chimic întreprins în această lucrare a pus în evidență lipsa componenților chimici caracteristici pereților celulelor normale de *Cl. perfringens*, la tulpina penicilino-rezistentă. Acidul *LL*-α-ε- diaminopimelic, glucozamina, galactozamina, ramnoza și un spot neidentificat, pus în evidență pe cromatograma pe hîrtie, cu ajutorul ftalatului de anilină, prezenți în peretele celular al tulpinii normale de *Cl. perfringens*, nu se găsesc în constituția celulei tulpinii penicilino-rezistente. Aceste date, coroborate cu rezultatele cercetărilor morfologice electronooptice și cu studiul biologic, confirmă lipsa totală a peretelui celular la această tulpină și o încadrează în grupa formelor „L" bacteriene.

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1729. BACIU I., COJOCARU A., ŞOI UZ V., MOCODEAN I. şi MUREŞAN V., *Fracţionarea proteinelor plasmatice pe coloană cu derivaţi de celuloză. I. Cromatografierea gamaglobulinelor,* Studii şi cercet. med., Cluj, 1961, *1*, 177—188.

Autorii descriu o metodă de separare cromatografică a γ-globulinelor pe carboximetilceluloză, în care eluarea fracţiunilor se face numai prin modificarea pH-ului şi a concentraţiei tamponului; modificarea concentraţiei soluţiei de NaCl se face doar în etapa finală. Cu această metodă autorii au obţinut separarea γ-globulinelor în 8 fracţiuni principale.

C. Gurban

1730. UNTERMAN W. şi MIRONEANU TH., *Influenţa unor antibiotice (Polimixina, Viomicina, Neomicina, Eritromicina, Lactobionat, Nistal ină) asupra migrării cromatografice şi electro-cromatografice a unor cationi,* Studii şi cercet. chim., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 59—66.

Antibioticele amintite pot servi la separarea analitică a amestecului de diferite metale: Cu, Ni, Co, Fe, Zn, Cd, Mn, Hg şi U. Electro-cromatografia complecşilor formaţi se deplasează spre catod.

A. Batcu

1731. BABEI E., *Citirea prin eluţie a lipoproteinelor după electroforeză pe hîrtie,* Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 85—89.

Se foloseşte metoda clasică pe hîrtie de filtru, făcîndu-se paralel o proteinogramă cu 0,01 ml ser şi o lipidogramă cu 0,04 ml ser. Se expune experienţa personală pe analiza serului a 200 persoane sănătoase şi bolnave.

A. Batcu

1732. BALMUŞ P. şi MAGERU V., *Utilizarea unor izotopi radioactivi în medicină* (^{222}Rn, ^{32}P, ^{131}I), Studii şi cercet. med., Iaşi, 1961, **XII**, *2*, 335—347.

Se indică în clinica balneologică utilizarea izotopilor drept sursă exterioară de radiaţii. Se indică modul de acumulare şi eliminare a iodului în glanda tiroidă în diverse afecţiuni. Se indică cantitatea de fosfor radioactiv reţinut de organism în administrarea orală sau parenterală.

A. Batcu

1733. CONSTANTINESCU O., CONSTANTINESCU M. şi GHERGHESCU A., *Molecule marcate de uz medical obţinute la Institutul de Fizică Atomică Bucureşti*, Fiziol. norm. pat., 1962, *3*, 281—286.

Se descriu metodele folosite pentru obţinerea de *D,L*-metionină marcată cu ^{35}S, *3,5*-diiodotirozină marcată cu ^{131}I şi de trioleină marcată cu ^{131}I.

E. Cristea

1734. CIUREŞ AL., VASILESCU V. şi CONSTANTINOV M., *Un dispozitiv pentru citospectrofotometrie şi unele date obţinute cu ajutorul acestei metode*, Fiziol. norm. pat., 1962, *6* 543—547.

Se descrie un dispozitiv citospectrofotometric în lumină vizibilă. Noul dispozitiv a fost utilizat pentru studierea limfocitelor de la diferite specii de animale.

E. Cristea

1735. VASILESCU V., TOPA V., GHIŢĂ C. şi TRUTIA E., *Studiul spectrofotometric al soluţiilor de ADN şi contergan, supuse iradierii cu ultraviolete*, Fiziol. norm. pat., 1963, *1*, 13—17.

Iradierea conterganului în soluţie apoasă duce la apariţia a doi produşi fotochimici; iradierea unui amestec de contergan şi ADN determină o scădere a maximului de absorbţie al ADN-ului şi o uşoară deplasare în spre lungimi de undă mai mici; iradierea unui amestec de timină şi contergan duce la o scădere netă a maximului de absorbţie al timinei.

E. Cristea

1736. PÎNTEA C., *Ipoteza prof. H. Vasiliu asupra configuraţiei moleculelor substanţelor proteice în lumina concepţiilor actuale*, Lucr. şt. Inst. Agronomic Iaşi, 1961, 5—26.

Se face o trecere în revistă a teoriilor referitoare la structura moleculei substanţelor proteice, dezvoltîndu-se în special teoria spiralei a lui Pauling şi Corey; în paralel, se descrie

ipoteza profesorului H. Vasiliu, elaborată în 1935—36. Prin aceasta, prof. H. Vasiliu se situează printre primii cercetători care au susţinut structura spiralată a proteinelor. Sînt reproduse şi schemele configuraţiei moleculelor substanţelor proteice, prezentate de prof. H. Vasiliu.

A. Batcu

1737. HOLAN T., DORCA S., POGINGEANU P. şi URAY Z., *Studiul folosirii izotopilor în diagnosticul leziunilor colului uterin*, Oncol., radiol., 1963, **II**, *2*, 155—158.

Se demonstrează că fixarea selectivă a fosforului radioactiv în ţesuturi tumorale şi în inflamaţii poate servi ca metodă adjuvantă în diagnosticul diferenţial al neoplaziilor.

M. Furnică

1738. CHISLEAG GH. şi BRENER E., *Dificultăţi în radioprotecţie*, Oncol., radiol., 1963, **II**, *2*, 165—171.

Referat general, fără indicaţii bibliografice.

M. Furnică

1739. POPOVICI C., PALLADE S. şi LONDON M., *Valoarea practică a metodei cu albastru de bromtimol pentru determinarea activităţii colinesterazice*, Rev. igienă, 1962, *3*, 257—260.

S-a cercetat paralelismul dintre rezultatele obţinute prin micrometoda cu albastru de bromtimol şi cea cu hidroxilamină şi clorură ferică, folosite pentru determinarea activităţii colinesterazice a sîngelui. Rezultatele celor 100 probe efectuate pe 24 de muncitori agricoli care manipulau insecticide organofosforate au arătat că în peste 80% din determinări există o concordanţă strictă între cele două metode. Se conchide că metoda cu albastru de bromtimol poate fi folosită pentru aprecierea nocivităţii substanţelor organofosforate.

A. Popescu

1740. RALEA R. şi POPA A., *Cercetări asupra complexării aminoacizilor. II. Cercetări conductometrice asupra formării de complecşi în soluţie la ionii ferici şi cobaltoşi cu valina, serina şi acidul aminobutiric*, An. Univ. Iaşi, chim., 1960, **VI**, *4*, 1001—1012.

La pH-uri cuprinse între 3 şi 5, ionul feric formează cu aminoacizii enumeraţi doi ioni complecşi $(FeA)^{2+}$ şi $(FeA_3)^{2+}$. La primul complex, aminoacidul, sub forma unui ion negativ, este bicoordinat, iar în al doilea complex aminoacidul este legat ca un ion dipolar şi printr-un singur punct de coordinaţie. Ionul cobalt la pH 5—6 formează cu acizii aminaţi complecşi de forma $(CoA_1)^{2+}$, $(CoA_2)^{2+}$, $(CoA_4)^{2+}$ şi $(CoA_6)^{2+}$ în care coordinaţia se face printr-un singur punct. În mediul cu pH 10—11 se formează un singur complex (CoA_3) în care aminoacidul este legat sub formă de ion negativ bicoordinat.

A. Batcu

741. GHIMICESCU GH. şi MUSTEAŢĂ C., *O nouă micrometodă pentru determinarea valorii calorice a alimentelor şi raţiilor alimentare*, An. Univ. Iaşi, chim., 1960, **VI**, *4*, 1059—1065.

Oxidarea substanţelor organice din alimente se face cu ajutorul iodatului de potasiu în mediu de acid sulfuric, la 200°C. Iodul eliberat în aparat Parnas-Wagner cu vapori de apă este apoi titrat cu tiosulfat de sodiu 0,04 N ; 1 ml din această soluţie corespunde la 1,6 mg oxigen, iar factorul de conversiune în calorii este de 3,35 Kcal pentru 1 g oxigen.

A. Batcu

1742. VĂSCĂUŢIANU E. şi REVENT V., *Analiza apelor din regiunea Iaşi în vederea măririi producţiei de peşte*, An. Univ. Iaşi, chim., 1961, **VII**, *1*, 189—191.

Apele iazurilor cercetate prezintă un chimism favorabil pentru o bună dezvoltare a pisciculturii : lipsa fenomenelor de putrefacţie, fito- şi zooplanctonul bogat în săruri minerale şi substanţe organice, lipsa aminelor şi a hidrogenului sulfurat şi o bună aerare.

A. Batcu

1743. RALEA R., POPA A. şi SIMINIUC E., *Cercetări asupra formării de complecşi cu aminoacizii. III. Asupra formării de complecşi în soluţie a ionilor cuprici, ferici şi cobaltici cu acidul glutamic*, An. Univ. Iaşi, chim., 1962, **VIII**, *2*, 501—513.

Prin titrarea conductometrică, cercetări potenţiometrice şi polarografice s-a pus în evidenţă că în mediu acid sau alcalin cuprul formează complecşi mono- şi biglutamici prin două legături coordinative din cele trei posibile. În cazul cobaltului s-a pus în evidenţă formarea în trepte a complecşilor Co/Acid 1 : 1, Co/Ac 1 : 2, Co/Ac 1 : 3, Co/Ac 1 : 4, Co/Ac 1 : 6, acidul glutamic fiind legat de cobalt printr-un singur punct coordinativ. Fierul formează complecşi Fe/Ac 1 : 1, Fe/Ac 1 : 2 şi Fe/Ac 1 : 3.

A. Batcu

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR
III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR
IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR
V. ENZIME
VI. VITAMINE. HORMONI. ALŢI COMPUŞI BIOACTIVI

1744. VĂSCĂUŢIANU E., BOGDAN EL., MOTAŞ M. şi VICOL O., *Studiul compuşilor acidului nicotinic cu acidul fosforic şi rolul lor în biochimie (Nota I)*, An. Univ. Iaşi, chim., 1960, **VI**, *4*, 1107—1111.

Sînt sintetizaţi compuşii: *1*-$H_3PO_4 \cdot C_6H_5O_2N$; *2*-$H_2PO_4 \cdot C_2H_5 \cdot C_6H_5O_2N$; *3*-$H_2PO_4 \cdot C_2H_5 \cdot (C_6H_5O_2N)_2$; *4*-$H_3PO_4 \cdot (C_6H_5O_2N)_3$; *5*-$H_3PO_4 \cdot CH_3COCH_3 \cdot C_6H_5O_2N$; *6*-$H_3PO_4 \cdot (C_6H_5O_2N)_2$. Se constată că acţiunea vasodilatatoare este mai accentuată decît a acidului nicotinic. Compuşii determină scăderea tensiunii arteriale. Sînt acceptori de hidrogen ca şi acidul nicotinic şi nu influenţează acţiunea amilazei.

A. Batcu

1745. VĂSCĂUŢIANU E., JURCĂ V. şi ARTENIE V., *Cercetări asupra proprietăţilor unor compuşi organici cu acţiune la plante*. An. Univ. Iaşi, chim., 1961, **VII**, *1*, 193—201.

S-a cercetat influenţa *in vitro* a acizilor alfametilbetanaftoxiacetic, ortobenzilfenoxiacetic şi betanaftoxiacetic asupra activităţii amilazei, catalazei şi ureazei, în comparaţie cu acţiunea acidului *2,4*-diclorfenoxiacetic. În genere, aceste substanţe au o acţiune stimulentă cînd sînt în cantitate mică, şi de inhibare, prin precipitarea proteinelor, cînd sînt în cantitate mare. În plus, acizii cercetaţi precipită cuprul, cobaltul, nichelul, fierul, zincul şi magneziul.

A. Batcu

1746. VĂSCĂUŢIANU E. şi JURCĂ V., *Săruri ale acidului ascorbic şi influenţa acestor săruri asupra diferitor germeni (Nota I)*, An. Univ. Iaşi, chim., 1962, **VIII**, *2*, 523—528.

S-au preparat sărurile acidului ascorbic cu chinină, chinidină, cinconină, atropină, codeină, cofeină, berberină, hidrastină, nirvanină, novocaină, narceină şi beta-eucaină. În aceste săruri acidul ascorbic îşi păstrează toate proprietăţile.

A. Batcu

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1747. GHEORGHIU I., STANCA M., NIŢOIU I., CORMUŞ D. şi EUSTAFIEVICI O., *Factori care influenţează instalarea imunităţii la animale de laborator şi păsări*, Lucr. şt. Inst. Pasteur, Buc., 1962, **VI**, 341—349.

Imunitatea ce se instalează la cobai, şoareci sau găini este dependentă de natura antigenului, specia animală şi anotimpul cînd se practică vaccinarea.

D. Tănăsescu

1748. BLAZSEK V., *Contribuţii la studiul acizilor nucleici virali. III. Unele date în legătură cu proprietăţile acidului ribonucleic obţinut din virusul Coxsackie*. Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1963, **LXVII**, *1*, 87—92.

Prin degradare termică sau cu acid acetic, acidul ribonucleic izolat din virusul Coxsackie A_{10} îşi pierde capacitatea de a infecta. Prin metoda Sevag virusul nu poate fi deproteinizat. Metoda cu fenol nu degradează ARN-ul şi infecţiozitatea sa redusă nu este cauzată de condiţiile de preparare.

A. Batcu

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1749. ASANDEI-CERNĂTESCU A. şi SIMIONESCU C., *Asupra procesului de lignificare în tumori Crown-Gall.* Studii şi cercet. chim., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 129—140.

Procesul accelerat de lignificare a ţesuturilor vegetale tumorale vine să clarifice mecanismul de biosinteză a ligninei. S-au studiat plantele *Solanum lycopersicum* şi *Pellargonicum zonale*, la care s-au provocat tumori Crown-Gall prin *Bacterium tumefaciens*. Rădăcinile plantelor au fost introduse în soluţie de *D*-glucoză ^{14}C timp de 8, 18 şi 24 de ore şi din ele s-a separat cantitativ celuloza şi lignina. S-a constatat că în părţile sănătoase lignina şi celuloza prezintă o radioactivitate mai mare decît în ţesutul tumoral, în care se înregistrează cantităţi mai mari de lignină decît de celuloză. Planta pare să transforme cea mai mare cantitate de glucoză în lignină şi nu în celuloză. Surplusul de lignină în tumoră se explică fie prin utilizarea şi a altor surse în afară de glucoză, fie admiţînd că celuloza este un precursor al ligninei.

A. Batcu

1750. IEFTENIE L. şi FIŞEL S., *Analiza calitativă a zaharurilor din nectarul cîtorva plante prin metoda cromatografică pe hîrtie*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1960, 283—286.

S-a analizat, prin cromatografie compoziţia calitativă în zaharuri a nectarului din 5 plante şi s-a găsit în : — *Pulmonaria millisima* : sucroză > glucoză > fructoză ; — *Lamiuum maculatum* : sucroză > fructoză > glucoză > rafinoză ; — *Acer platanoides* : fructoză > sucroză > glucoză ; — *Tilia tomentosa* : glucoză > fructoză > sucroză > rafinoză > maltoză ; — *Crataegus monogyna* : glucoză > fructoză > sucroză.

A. Batcu

1751. PÎNTEA C., TĂRNĂUCEANU E., UNTU A., LEONTE A. şi CIUREA G., *Eficienţa microelementelor asociate la floarea soarelui, porumb şi sfeclă de zahăr*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1961, 195—202.

La plantele experimentale s-a constatat o eficienţă mare prin microelementele asociat B + Cu şi Cu + Zn. Asocierea de microelemente Mn + Cu a avut o eficienţă redusă la floarea soarelui şi porumb şi mai ridicată la sfecla de zahăr.

A. Batcu

1752. PLATON M., *Dinamica glucidelor la porumb*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1962, 111—124.

S-au cercetat glucidele în tulpina şi frunzele plantelor de porumb în timpul vegetaţiei acestuia. În primele faze de vegetaţie cantitatea glucidelor este mică şi este folosită pentru nevoile proprii ale plantei. În faza de 12—13 frunze glucidele încep să se acumuleze, ajungînd la valoarea maximă în faza de maturitate în lapte. O dată cu trecerea spre faza de maturitate în ţintă glucidele încep să scadă, ajungînd la minimum la sfîrşitul perioadei de vegetaţie. În tulpină predomină zaharoza. În frunze glucidele sînt totdeauna în cantitate mai mică decît în tulpină. Cantitatea maximă de glucide este atinsă în frunze în faza de înflorire şi în faza de maturitate în lapte timpurie. În limbul frunzei predomină zaharurile solubile reducătoare.

A. Batcu

1753. PÎNTEA C., POPESCU I. şi SOFRONE GR., *Studiul eficienţei termofosfaţilor la porumb şi floarea soarelui*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1962, 203—210.

În condiţiile anului 1960, termofosfatul a determinat sporuri de recoltă la porumb şi floarea-soarelui practic egale cu acelea determinate de superfosfat, iar pe un sol cu reacţia slab acidă, administrat singur, fără a fi asociat cu azotatul de amoniu, a fost superior superfosfatului. Asimilaţia P_2O_5 de către plantele experimentate, porumb şi floarea-soarelui, s-a constatat a fi asemănătoare asimilaţiei P_2O_5 din superfosfatul administrat în cantităţi echivalente.

A. Batcu

1754. VĂSCĂUŢIANU E., ARTENIE V., ACHIŢEI E. şi PAVEL I., *Studiul biochimic al unui lot de 19 sorturi de soia ce se cultivă în ţara noastră*, An. Univ. Iaşi, chim., 1962, VIII, *2*, 535—539.

Sorturile Herb 620, ICAR 645, ICAR 460, Amurskia 41, Lincoln, sînt cele mai bogate în proteine, mergînd pînă la 39,27% proteine. Cele mai bogate în grăsimi sînt sorturile Chippewa, Reiner, Mandarin, Harkovskaia 149, Iaşi B-60 care conţin pînă la 22,34% grăsimi. Sorturile de soia studiate sînt destul de bogate în fermenţi. Din punct de vedere al compoziţiei minerale a cenuşii, cele mai bogate în fosfor sînt sorturile Plattergelbe, ICAR 460, Mandarin, Iaşi H_2, ICAR 50/111, iar în potasiu cele mai bogate sînt sorturile Chippewa, Iaşi 50/5, ICAR 50/111.

A. Batcu

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1755. MANTA I., MAIER N. şi LAZĂR TR. C., *Variaţiile proteidelor serice la animale cu sistemul reticulo-histocitar blocat*, Studii şi cercet. med., Cluj, 1961, *1*, 33—37.

Autorii au studiat electroforetic, la animale cu sistemul reticulo-histocitar blocat cu tuş de China, proteinele, gluco- şi lipoproteinele. Au constatat scăderea albuminelor şi creşterea globulinelor, în special a α- şi β-globulinelor. De asemenea, s-au observat modificări ale gluco- şi lipoproteinelor.

C. Gurban

1756. CUPARENCU B., BÎRSAN E. T., GROSU L., GĂVRUŞ AL. şi RUSU J., *Modificările activităţii glicogen-fosforilazei în miocardul, muşchiul scheletic şi plămînul şobolanilor suprarenalectomizaţi*, Studii şi cercet. med., Cluj, 1961, *1*, 39—45.

S-a studiat modificarea activităţii fosforilazice a omogenatelor de miocard, de muşchi scheletici şi de plămîn obţinute de la şobolani suprarenalectomizaţi. S-a constatat o creştere a activităţii fosforilazei, în toate ţesuturile, la 9—12 zile după ablaţia bilaterală a suprarenalelor.

C. Gurban

1757. NANA A., VASILESCU V., TOADER C., MIRCIOIU C., TOADER A., SECĂREANU ŞT., GOINA E., BĂLTESCU V., POPA L., BOTEZ V. şi POPESCU A., *Cercetări experimentale asupra modificărilor echilibrului proteic tisular în şoc*, Studii şi cercet. med. Cluj, 1961, *2*, 233—242.

Autorii au studiat variaţiile cantitative ale proteinelor tisulare şi ale acizilor nucleici în diferite ţesuturi, prelevate de la şobolani în timpul şocului şi după diferite intervale de la producerea şocului. S-a constatat scăderea cantităţii de proteine în toate ţesuturile studiate, cu excepţia creierului. Cantitatea de ADN scade în toate ţesuturile, mai accentuat în creier şi în miocard; cantitatea de ARN creşte.

C. Gurban

1758. TELIA M., CUCUIANU M., UZA GH. şi POP L., *Studiul proteinelor şi mineralelor din muşchiulatura striată la iepuri în insuficienţa renală acută experimentală*, Studii şi cerct. med., Cluj, 1962, *1*, 41—47.

S-au urmărit variaţiile cantitative ale proteinelor şi ale concentraţiilor sodiului şi potasiului în muşchiul striat al iepurelui, după nefrectomia bilaterală. S-a constatat că în primele faze ale insuficienţei renale proteinele musculare extractibile scad, iar în fazele mai avansate ţesutul se distruge. Concentraţiile sodiului şi potasiului suferă modificări mici abia în stadiul terminal al sindromului.

C. Gurban

1759. CHERA GH. şi ENESCU L., *Acţiunea tripsinei asupra evoluţiei leziunilor pulmonare provocate cu tetraclorură de carbon*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1961, **XII**, *2*, 363—373.

Administrarea de tripsină măreşte permeabilitatea capilară, agravînd evoluţia leziunilor pulmonare şi intensifică reacţiile locale histocitare şi scleroza consecutivă.

A. Balcu

1760. NIŢULESCU I., WASSERMAN L. şi DOLINESCU S., *Influenţa unui regim alimentar dezechilibrat asupra evoluţiei leziunilor vasculare. II. Studiul urmărilor îndepărtate ale leziunilor vasculare provocate prin hipervitaminoză D la şobolani*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 41—49.

Prin hipervitaminizarea şobolanilor carenţaţi în vitamină A cu calciferol 80 000 U, timp de 15 zile, se observă procese de calcificare vasculară caracteristice excesului de calciferol, chiar după readucerea animalelor la un regim alimentar normal.

A. Batcu

1761. ARAŢEI H. şi MIRONEANU T., *Geneza hormonilor ovarieni. II. Cîteva date chimice şi fizico-chimice asupra lichidului folicular la suidee*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 101—110.

S-a cercetat în sîngele şi lichidul folicular al suideelor vîscozitatea, densitatea, indicele de refracţie, azotul total, proteinele, azotul polipeptidic, grăsimile, glucidele, colesterolul, umiditatea şi cenuşa. Constantele analizate nu sînt totdeauna comparabile între serul sangvin şi lichidul folicular. Din datele obţinute rezultă că lichidul folicular prezintă caracteristicile unui transsudat sangvin modificat.

A. Batcu

1762. RĂŞCANU V., DOROGAN D., ROTARU C., ŞTEFAN I. şi DRĂGAN P., *Contribuţii la studiul variaţiei constantelor fizico-chimice ale sîngelui în timpul colapsului hemoragic experimental şi al reanimării*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *2*, 265—272.

Starea de hipoxie, consecutivă sîngerării masive, determină apariţia de tulburări profunde ale constantelor fizice (densitate, tensiune superficială, conductibilitate electrică, indice refractometric) şi chimice (Na, K, Ca, Mg, fracţiuni proteice). Toate constantele scad, cu excepţia Ca şi a alfaglobulinelor.

A. Batcu

1763. NIŢULESCU I., WASSERMANN L. şi DOLINESCU S., *Influenţa unui regim alimentar dezechilibrat asupra evoluţiei leziunilor vasculare. III. Acţiunea acidului nicotinic asupra leziunilor vasculare provocate prin hipervitaminoza D pe fondul unei carenţe prealabile de vitamină A*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *2*, 285—297.

Administrarea separată sau asociată a vitaminelor PP (5 mg pe zi) şi D_2 (40 000 UI) timp de 15 zile, la şobolani tineri cu regim normal, a dus la o congestie viscerală mică; administrate pe un fond carenţat în vitamina A, au determinat alterări degenerative şi calcificări. Se atrage atenţia asupra prudenţei cu care trebuie condus tratamentul cu vitamină D la copii cu tulburări de nutriţie şi stări distrofice, cît şi asupra primejdiei unor asocieri polivitaminice abuzive.

A. Batcu

1764. ARAŢEI H. şi OLARU D., *Geneza hormonilor ovarieni. III. Determinarea elementelor anorganice din lichidul folicular, membrana foliculară şi serul sangvin la suidee cu ajutorul spectroscopiei de emisie*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *2*, 383—390

Sodiul şi potasiul, prezenţi în ser şi lichid, sînt absenţi în membrana foliculară. Calciul este mai scăzut în ser şi lichid, faţă de membrana foliculară. Cuprul şi iodul nu au fost găsiţi în nici o parte a ovarului. Determinările au fost făcute prin calcinare la 950°C şi analiză cu spectrograful de emisie între 4 000 şi 6 500 A°. În lichidul folicular, elementele găsite în ordine descrescîndă sînt : Na, K, Ba, Ca, Mg ; iar în membrana foliculară : Ca, Ba, Mg şi probabil Cr.

A. Balcu

1765. SZABO ST., SZEKELY I., GYERGYAY F. şi MODY E., *Comportarea proteinelor miocardice în disproteinemii*, Fiziol. norm., pat., 1961, *4*, 259—263.

S-a studiat comparativ, comportarea electroforetică a proteinelor serice şi a celor miocardice, extractibile în mediu salin, la animale tratate cu acid silicic sau cu ulei de terebentină. Aceste tratamente provoacă disproteinemii caracterizate prin scăderea albuminelor şi creşterea unor fracţiuni globulinice. Proteinele miocardice suferă modificări asemănătoare : creşte proporţia fracţiunilor cu mobilitate mare şi scade aceea a fracţiunilor cu mobilitate mai mică.

E. Cristea

1766. GHEORGHIU P., STROESCU V. şi SCHWARTZ R., *Cercetări privind mecanismele biochimice care intervin în potenţarea efectului narcotic al hexobarbitalului sodic prin clorpromazină*, Fiziol. norm., pat., 1961, *5*, 351—358.

Autorii studiază efectele clorpromazinei şi hexobarbitalului, separat sau împreună, asupra consumului de oxigen şi a oxidării glucozei în omogenate de creier de şobolan. Asocierea celor două substanţe a dat rezultate aditive, ceea ce arată că potenţarea acţiunii narcotice a hexobarbitalului prin clorpromazină nu poate avea loc prin inhibiţia respiraţiei ceulelor cerebrale.

E. Cristea

1767. VASILESCU V., NICULESCU V., CĂPÎLNĂ S., BORDEIANU A. şi GHIZARI E., *Cercetări experimentale asupra compoziţiei biochimice şi efectelor biologice ale unor extracte de ficat*, Fiziol. norm., pat., 1962, *1*, 13—18.

Autorii au analizat extractele apoase obţinute din ficat în curs de regenerare, în privinţa compoziţiei lor în aminoacizi şi, pe de altă parte, în privinţa efectelor biologice produse de aceste extracte. Analiza cromatografică a extractelor hepatice provenite de la iepuri a arătat o creştere a cantităţii de metionină, alanină şi a leucinelor în primele 24 şi 48 de ore după hepatectomie. Injectarea la şobolani a acestor extracte determină o creştere a aminoacizilor liberi din ser.

E. Cristea

1768. CUPARENCU B., MOCODEANU I., VASILE V. AL., ROSENBERG A. şi BOZAC A., *Modificările proteinemiei şi ale proteinogramei la şobolanii cu măduva spinării secţionată*, Fiziol. norm., pat., 1962, *2*, 119—127.

Autorii au urmărit efectele secţionării măduvei spinării a şobolanilor asupra proteinemiei, proteinogramei şi conţinutului în azot total al ficatului. Ca animale martor au servit şobolani care au suferit o pseudo-operaţie. Secţionarea măduvei împiedică creşterea fracţiunii α_2-globulinice care se produce în urma stressului operator, dar nu împiedică apariţia hipoproteinemiei şi a hipoalbuminemiei conţinutul în azot al celor două loturi nu prezintă diferenţe semnificative.

E. Cristea

1769. DOROGAN D. şi ROTARU C., *Cercetări electroforetice asupra albuminelor hidrosolubile din muşchii antagonişti, în raport cu excitabilitatea şi rolul formaţiunii reticulate, în homeostazia lor*, Fiziol. norm., pat., 1962, *2*, 131—142.

Autorii au urmărit stabilirea unei corelaţii între conţinutul procentual în albumine hidrosolubile al muşchilor antagonişti şi excitabilitatea lor cronaxică şi rolul formaţiunii reticulate n stabilirea acestei corelaţii.

E. Cristea

1770. PÎNTEA C., IONESCU D., ABABI V., LEONTE A. şi DULCEANU N., *Corelaţia dintre cistita hemoragică a taurinelor şi cantitatea de microelemente din apă, furaje şi sol*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1962, 237—244.

S-a cercetat răspîndirea microelementelor Mo, Co, Cu, Zn în trei profile de soluri din comuna Asău-Agaş (Reg. Bacău), precum şi în apă şi furaje in raionul Cîmpulung Moldovenesc, deoarece în aceste regiuni se întîlnesc cazuri frecvente de cistită hemoragică. În solurile cercetate se constată cantităţi suficiente de Cu, Zn şi Mn, mai mari de Co şi mai reduse de Mo decît în solurile normale. Sursele de apă conţin concentraţia normală, iar în furaje se semnalează o insuficienţă de Co şi un excedent de Zn şi Mn faţă de limitele admise.

A. Batcu

1771. DRUGOCIU G., TURLIUC O., SCHAAS I., UJICĂ V., ŢIPU I. şi ANDREESCU D., *Cercetări noi privind rolul vitaminelor A şi E asupra spermatogenezei şi ridicării valorii biologice a spermei la taur*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1962, 255—262.

La 2—4 săptămîni după administrarea parenterală, timp de 5—10 zile consecutiv, de 200 000 U.I. vit. A şi 0,2 g vit. E zilnic, se constată o creştere a valorii biologice a spermei prin creşterea spermatogenozei şi secreţiei interne a testicululi.

A. Batcu

1772. DRUGOCIU GH., TURLIUC O., COTRUŢ M., SCHAAS I. şi ANDREESCU D., *Cercetări privind rolul vitaminelor A şi E asupra spermatogenezei şi ridicării valorii biologice a spermei de taur*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1962, 353—362.

Administrarea parenterală a vit. A în doze de 200 000—300 000 U.I. zilnic şi a vit. E în doze de 0,2 g zilnic separat sau asociate timp de 5 zile consecutiv, la tauri Schwitz tineri, după o perioadă lungă de furajare cu raţii incomplete care determină o stare de policarenţă a organismului, este favorabilă pentru ridicarea valorii biologice a spermei obţinute de la aceştia. Cantitatea de vit. A de 200 000 U.I., administrată zilnic intramuscular, şi cantitatea de vit. E de 0,2 g, administrată zilnic pe o perioadă de 5 zile consecutiv, poate fi folosită pe teren în cazul cînd, datorită subalimentaţiei sau numai unei hipovitaminoze A şi E, sperma taurilor are o valoare biologică scăzută.

A. Batcu

1773. DRUGOCIU GH., TURLIUC O., COTRUŢ M. şi MÎNDRU V., *Cercetări privind rolul vitaminelor A şi E asupra spermatogenezei şi a ridicării valorii spermei la berbeci*, Lucr. şt. Inst. Agronomic, Iaşi, 1962, 363—370.

Administrarea intramusculară a vit. A în doze de 20—40 ori mai mari decît necesarul zilnic şi a vit. E în doze de 2—4 ori mai mari decît necesarul zilnic, la berbeci de diferite vîrste, în perioada de montă, după o perioadă de furajare care indică o stare de hipovitaminoză A şi E, este favorabilă pentru ridicarea valorii biologice a spermei. Doza optimă de vit. A şi E care trebuie administrată berbecilor cu hipovitaminoza A şi E pentru a obţine activarea spermatogenezei şi ridicarea valorii biologice a spermei pare a fi de circa 1 000 000 U.I. vit. A şi 0,03 g vit. E, timp de 5 zile consecutiv, la 100 kg greutate vie.

A. Batcu

1774. POPESCU A. R., TICAN V., CONSTANTINESCU C., CONSTANTINESCU CR. şi TOTORCEA N., *Cercetări electroforetice asupra proteinelor din serul cabalinelor hiperimunizate antirujetic*, Lucr. şt. Inst. Pasteur, Buc., 1962, VI, 209—218.

S-au studiat prin electroforeza pe hîrtie valorile proteinelor serice după hiperimunizare cu 2,35 ml cultură virulentă, inoculată intravenos în 11 doze progresive, la interval de 7 zile. S-a observat o uşoară creştere a proteinemiei, cu creşteri marcate de gama- şi mai puţin de beta-globuline, care a coincis cu nivelul cel mai înalt al anticorpilor serici. Se consideră că tehnica electroforetică poate ajuta, dar nu substitui, metodele clasice de titrare.

D. Tănăsescu

1775. TACU D., ISOPESCU I., GOCIMIAN I. şi MÎNDRAŞ T., *Electroforegrama fracţiunilor proteice sangvine la purceii născuţi din mame vaccinate antirujetic şi care au fost hrăniţi natural sau artificial*, Lucr. şt. Inst. Pasteur, Buc., 1962, VI, 227—233.

S-au urmărit timp de 6 luni electroforegramele pe animale născute din mame vaccinate cu 3 luni înainte de naştere. Valorile alfa-globulinelor sînt între limite normale, ale beta-globulinelor şi gama-globulinelor sînt uşor crescute la purceii hrăniţi natural şi mai puţin crescute la cei hrăniţi artificial, iar ale albuminei sînt scăzute, la ambele categorii de purcei, în prima săptămînă şi crescute apoi pînă la sfîrşitul experienţelor.

D. Tănăsescu

1776. TACU D., ISOPESCU I. şi BURDUCEA O., *Detectarea bacililor* Erysipelothrix Rhusiopathiae *marcaţi cu izotopi radioactivi în organismul porumbeilor*, Lucr. şt. Inst. Pasteur, Buc., 1962, **VI**, 241—245.

S-a detectat radioactivitatea în rinichi, splină, ficat, pulmon, cord şi creier de porumbei, după 1, 3, 5 şi 46 zile de la inocularea germenilor dezvoltaţi pe culturi cu ^{32}P. Radioactivitatea organelor variază în funcţie de zilele trecute de la inoculare.

D. Tănăsescu

1777. DIACONU M., FAUR G. şi NIŢOIU I., *Alexina liofilizată şi întrebuinţarea ei în medicina veterinară*, Lucr. şt. Inst. Pasteur, Buc., 1962, **VI**, 275—287.

Alexina liofilizată are un titru constant de 0,16—0,19 şi, în reacţia de fixare a complementului pentru titrarea unor antigene sau seruri, valori identice cu cea neliofilizată, proaspătă, dar nu se alterează nici după 8 luni de la preparare (cea neliofilizată are un timp de întrebuinţare mult mai scurt).

D. Tănăsescu

1778. MINCU P., PODORIAN S. şi PAMBUCCIAN GR., *Modificări produse în organism în urma administrării bioxidului de siliciu pe cale digestivă*, Rev. igienă, 1962, *2*, 125—140.

În experienţe efectuate pe 66 de şobolani albi s-a constatat că administrarea zilnică, o dată cu hrana, a 250 mg pulbere de SiO_2/animal are ca efect concentrarea substanţei în plămîn, stomac, intestinul subţire, intestinul gros, splină, rinichi, sînge şi urină. Concentrarea maximă a fost atinsă după 90 de zile şi apoi a scăzut treptat, deşi s-a continuat administrarea de SiO_2. Paralel cu dozările de SiO_2 s-au făcut examene histologice şi anatomopatologice.

A. Popescu

1779. VĂSCĂUŢIANU E., JURCĂ V. şi DASCĂLU A., *Metabolismul fosforului, calciului şi al carotenoidelor la găini şi în ouăle acestor păsări în legătură cu condiţiile de viaţă*, An. Univ. Iaşi, chim., 1962, **VIII**, *2*, 529—534.

Conţinutul în carotenoide din gălbenuşul ouălor găinilor crescute în libertate, pe terenuri înverzite, este în medie de 92,153 mg/g gălbenuş, faţă de 18,026 mg/g în gălbenuşul celor

crescute în padocuri, ceea ce influenţează direct vitalitatea puilor obţinuţi. Fosforul creşte paralel cu creşterea carotenoidelor, deşi variaţiile sale sînt mai mici. Conţinutul în carotenoide al gălbenuşului ouălor găinilor crescute în padocuri în lunile martie şi iulie este sub limita recomandată pentru incubaţie. Deci, calitatea acestor ouă pentru incubaţie este net inferioară. Pentru a avea cel mai bun procent de ecloziune a ouălor şi pentru a avea pui normali şi viguroşi, trebuie folosite ouăle de la găinile crescute în libertate, pe terenuri înverzite.

A. Batcu

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1780. MIHALCA E., BUTNARU J., ROMAN-GROSU M. şi MACAROVICI R., *Metabolismul hidraţilor de carbon şi unele probleme de patogenie în distrofia sugarului*, Studii şi cercet. med., Cluj, 1961, *1*, 157—168.

S-au studiat curbele de hiperglicemie provocată la 60 de sugari distrofici. Caracterele curbelor depind de etiopatogenia distriofiei mai mult decît de gradul distrofiei sau de vîrsta sugarului.

C. Gurban

1781. DUMA D., POPOVICIU L., ARGINTARU D. şi GRECU FL., *Dereglări ale metabolismului lipidic şi proteic în unele sindroame hipotalamice*, Studii şi cercet. med., Cluj, 1961, *2*, 307—315.

Autorii au studiat variaţiile colesterolemiei, lipemiei totale, proteinemiei totale şi ale distribuţiei electroforetice a lipidelor şi proteinelor din ser în sindroame hipotalamice. Modificările cele mai accentuate ale lipidelor au fost observate în sindroamele hipotalamice cu obezitate şi în narcolepsie. S-a constatat o creştere a colesterolemiei, a lipemiei totale şi în special a β-lipoproteinelor. În ceea ce priveşte distribuţia proteinelor, γ-globulinele au fost crescute în 79,4% din cazuri şi β-globulinele în 40%.

C. Gurban

1782. MOGA A., CUCUIANU M. şi UZA GH., *Aspecte ale metabolismului proteic în insuficienţa renală acută*, Studii şi cercet. med., Cluj, 1962, *1*, 23—33.

Autorii au studiat comportarea glicoproteinelor serice şi a fibrinogenului în insuficienţa renală acută. Ei constată o creştere accentuată a glicoproteinelor şi a fibrinogenului în ser, după 2—3 zile de la instalarea anuriei. Autorii consideră drept cauză a acestor modificări tulburările hidroelectrolitice determinate prin intermediul suprarenalelor.

C. Gurban

1783. BABEI E., HODAN O. şi CUCU R., *Aspectele electroforetice şi ale lipidelor sangvine în boala hipertonică*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 91—99.

Lipidele totale, colesterolul, testul Kunkel cu fenol şi lipoproteinele sînt frecvent crescute la hipertensivi. Sub 50 ani, în stadiul neurogen, se constată frecvent hipercolesterolemie şi hiperlipemie, iar în stadiul visceralizat sînt crescute lipoproteinele lente şi testul cu fenol.

A. Balcu

1784. BALMUŞ P., MAGERU V., NUBERT GR., CARASIEVICI V., RUGINĂ V., POPOVICI N., ADRILIAN V., BRAER R., MOISE B. şi POLAC S., *Studiul clinic, biochimic şi cu fosfor radioactiv al condrocalcinozei articulare generalizate*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *1*, 175—180.

În condrocalcinoza articulară generalizată familială se constată tulburarea metabolismului fosfocalcic, demonstrat de autori prin cercetarea eliminării urinare a fosforului radioactiv.

A. Balcu

1785. BALMUŞ P., MAGERU V., NUBERT GR., CARASIEVICI V., RUGINĂ V., POPOVICI N., ADRILIAN V., BRAER R., MOISE B. şi POLAC S., *Studiul osteoporozelor prin fosfor radioactiv*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *2*, 181—191.

Eliminarea urinară a fosforului radioactiv este crescută în osteoporoză şi scăzută în osteomalacie, mergînd paralel cu variaţiile fosfocalcice. În osteoporozele maligne, şi mai ales în mielomatozele decalcifiante difuze, fosforul radioactiv este reţinut de celulele în mitoză, diminuîndu-se astfel eliminarea sa renală.

A. Balcu

1786. BABEI E., CUCU R. şi HODAN O., *Aspecte electroforetice şi ale lipidelor sanguine în ateroscleroza coronariană*. Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XIII**, *2*, 299—310.

La ateromatoşi se constată o creştere frecventă a lipidelor totale, a lipoproteinelor lente, scăderea albuminelor şi creşterea $alfa_2$- şi beta-globulinelor, confirmîndu-se datele din literatură. Variaţiile sînt mai evidente la femei. La ateromatoşii hipertensivi predomină modificările lipidelor, iar la cei hipotensivi predomină variaţiile proteinelor.

A. Balcu

1787. ROTARU C., TRIFAN N., CHERA GH., STRATONI A. şi STOICA A., *Valoarea, mucoproteinuriei la noii născuţi normoponderali şi imaturi*, Studii şi cercet. med., Iaşi, 1962, **XII**, *2*, 433—440.

Reacţia Donnagio este foarte intensă la imaturi, are valori intermediare la subponderali şi valori minime la eutrofici.

A. Batcu

1788. GONŢEA I., ŞUŢESCU P. şi JANTEA F., *Nevoia de proteine a omului în muncă. V. Influenţa efortului fizic asupra bilanţului azotat în funcţie de mărimea aportului proteic*, Fiziol. norm., pat., 1961, *4*, 275—279.

La o dietă de 1 g proteină/kg greutate corporală, bilanţul azotat, pozitiv în perioada de activitate sedentară, devine negativ în perioada de efort fizic, pierderile de azot ajungînd pînă la 3—4 g azot pe zi. La o dietă cu 1,5 g proteină/kg greutate corporală, pierderile de azot cresc în timpul efortului fizic, totuşi bilanţul azotat nu se negativează.

E. Cristea

1789. GONŢEA I., ŞUŢESCU P. şi DUMITRACHE S., *Nevoia de proteine a omului în muncă. VI. Influenţa adaptării la efort asupra bilanţului azotat*, Fiziol. norm., pat., 1962, *1*, 29—36.

S-au determinat bilanţurile azotate la un grup de 7 persoane care efectuau zilnic un travaliu fizic intens. Din prima zi de efort, bilanţurile azotate s-au negativat şi pierderile de azot s-au accentuat pînă în ziua a patra. Urmează apoi o diminuare a pierderilor de azot care, după 3 săptămîni de efort, s-au redus la 74—85% din pierderile din primele zile. Autorii interpretează aceste fapte printr-o adaptare a organismului la condiţiile de alimentaţie.

E. Cristea

1790. COMOROŞAN S., *Exosmoza electroliţilor din piele în condiţii de muncă, la abataje de cărbune*, Rev. igienă, 1962, *2*, 141—143.

În experienţe făcute pe 100 muncitori lucrînd la abataje de cărbune s-a urmărit exosmoza electroliţilor din piele, prin măsurători electrometrice. Determinările au arătat că exosmoza electroliţilor din piele este mai mare la mineri decît la adulţii lucrînd în condiţii obişnuite de muncă. Valori maxime au prezentat minerii neadaptaţi la temperatura ridicată (1—5 ani vechime în munca din mină).

A. Popescu

1791. GABOR S., ORHA B. şi RISCA G., *Aprecieri asupra unor modificări enzimatice la muncitorii expuşi substanţelor nitroaminoderivate*, Rev. igienă, 1962, *3*, 235—238.

S-a cercetat activitatea catalazelor sangvine şi peroxidazelor leucocitare la 83 de muncitori care manipulau substanţe nitroaminoderivate. Concomitent s-a determinat şi numărul hematiilor. Rezultatele au arătat că activitatea catalazelor sangvine a scăzut paralel cu durata expunerii la toxice, iar activitatea peroxidazelor leucocitare a variat în sens invers. Anemia, instalată în primul an de contact cu toxicul, s-a menţinut tot timpul expunerii la toxice.

A. Popescu

1792. BERBERIANU L., DANCĂU N. şi MITESCU GH., *Proba reducerii permanganatului de potasiu în lichidul cefalo-rahidian la copiii cu meningită tuberculoasă*, Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1963, **LXVII**, *1*, 125—129.

În 23 cazuri de meningită tuberculoasă timpul de reducere a permanganatului de către lichidul cefalorahidian a fost foarte scăzut, scăderea fiind paralelă cu gravitatea bolii; spre vindecare, testul revine la normal.

A. Batcu

1793. STRĂCHINARU I., *Despre eficienţa acţiunilor psihopedagogice exercitate asupra copiilor oligofreni trataţi cu acid glutamic şi cafeină*, Rev. medico-chirurgic., Iaşi, **LXVII**, *1*, 193—198.

S-a urmărit dezvoltarea timp de 4 ani a 15 copii debili mintal, parţial recuperabili, împărţiţi în trei grupe. S-au dezvoltat cel mai bine copiii grupei care a primit acid glutamic + cafeină şi tratament psihopedagogic, faţă de grupa care a primit numai acid glutamic + cafeină sau grupa la care s-a aplicat numai tratamentul psihopedagogic.

A. Batcu

XI. BIOCHIMIA NUTRIŢIEI

1794. SPORN A., RACOVEANU N. şi GHELERTER-CĂLINESCU L., *Cercetări cu privire la influenţa radiaţiilor ionizante asupra valorii nutritive a proteinelor şi lipidelor din conserve de carne de porc*, Rev. igienă, 1962, *1*, 31—39.

S-a cercetat, pe 125 de şobolani albi, valoarea nutritivă a proteinelor şi lipidelor din conserve de carne de porc în suc propriu, iradiate cu 100 000—500 000 r. S-a urmărit refacerea proteinelor hepatice, creşterea animalelor şi captarea ^{131}I de către tiroidă. Rezultatele au arătat că valoarea nutritivă a conservelor de carne este mai mică decît cea a cazeinei, fără diferenţe nete între conservele iradiate şi cele neiradiate.

A. Popescu

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ
XIII. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

1795. GABOR S., RAUCHER C., LEOCA M. şi GELERU R., *Cercetări experimentale privind toxicitatea unor substanţe chimice utilizate la fabricarea sticlei organice (plexi)*, Rev. igienă, 1962, *1*, 27—30.

S-a cercetat toxicitatea acetoncianhidrinei şi a etilacrilatului, experimentîndu-se pe 145 de şoareci albi. Menţinerea animalelor timp de 2 ore în atmosferă cuprinzînd 0,5—3 mg acetoncianhidrină/l aer a arătat că doza minimă narcotică este de 1—1,5 mg/l aer, iar doza minimă letală este de 2—2,5 mg/l aer. Menţinerea şoarecilor timp de 1 oră într-o atmosferă conţinînd 0,05—0,5 mg etilacrilat/l aer a determinat inhibarea activităţii citocromoxidazei din creier.

A. Popescu

NECROLOG

ALEXANDRU BATCU

(1922—1963)

La 21 iunie 1963 a decedat în mod tragic A. Batcu, conferenţiar la I.M.F. Iaşi, candidat în ştiinţe medicale. A fost unul din membrii eminenţi ai corpului didactic din Institutul de medicină din Iaşi şi al Uniunii Societăţii Ştiinţelor Medicale, Secţia de biochimie, al cărei secretar a fost şi în cadrul căreia a desfăşurat o activitate rodnică.

S-a născut la 25 iulie 1922. A absolvit Facultatea de medicină din Iaşi, fiind numit în anul 1945 preparator la laboratorul de fiziologie şi devenind ulterior asistent. În urma reorganizării învăţământului superior şi a I.M.F. Iaşi i s-a încredinţat organizarea laboratorului de biochimie şi conducerea lucrărilor practice. Aceste sarcini le-a rezolvat cu succes, în calitate de şef de lucrări şi, mai tîrziu, de conferenţiar. Depunînd o muncă neîntreruptă, a reuşit cu sprijinul conducerii I.M.F. să amenajeze şi să utileze cu aparatură modernă laboratorul în care cadrele didactice, cercetătorii şi studenţii au găsit condiţii optime de lucru şi dezvoltare. În dorinţa de a aprofunda problemele de biochimie şi-a completat pregătirea profesională urmînd şi absolvind Facultatea de chimie din Iaşi. Ca o încununare a muncii depuse în anul 1960 a obţinut titlul de candidat în ştiinţe medicale, specialitatea biochimie.

Devenit conferenţiar la Catedra de biochimie, A. Batcu a fost mult apreciat pentru activitatea sa didactică. Pentru a veni în sprijinul studenţilor şi a le uşura studiul biochimiei a editat un curs de lucrări practice, a cărui utilitate şi valoare s-a dovedit prin aceea că cele trei ediţii ale cursului s-au epuizat într-un interval foarte scurt, cursul fiind folosit şi de studenţii altor facultăţi. A contribuit la editarea în limba romînă a „Manualului de biochimie" al lui Zbarschi, apărut în două ediţii succesive, dînd astfel posibilitatea de a cunoaşte mai uşor literatura sovietică de specialitate. A contribuit la înfiinţarea primului cerc ştiinţific studenţesc din I.M.F. Iaşi, a ţinut cursuri de biochimie pentru medicii care urmează cursurile de perfecţionare suprauniversitare, precum şi pentru chimiştii de la fabrica de penicilină, în vederea completării cunoştinţelor lor de biochimie. A scris mai multe capitole din cursul unic de biochimie care urmează să apară în curînd. În ultimul timp s-a ocupat şi cu îndrumarea şi controlul tuturor laboratoarelor de biochimie din cadrul spitalelor regionale.

Înzestrat cu reale posibilităţi, A. Batcu a dat dovadă în toată activitatea sa de pasiune, entuziasm şi multă voinţă. Avea un talent deosebit de a influenţa în bine pe cei din jur. Era apreciat de studenţi, iar pe colaboratori reuşea să-i stimuleze într-un mod cu totul deosebit.

Activitatea sa ştiinţifică s-a concretizat în cercetări ştiinţifice publicate în reviste de specialitate din ţară şi străinătate, precum şi în referate ştiinţifice ţinute în cadrul secţiunilor Uniunii Societăţii Ştiinţelor Medicale.

În cercetările sale a abordat aspecte de biochimie medicală din următoarele domenii: 1) modificările metabolice produse de diverse boli (diabet insipid, reumatism, hepatită, astm bronşic etc.); 2) biochimia adaptării organismului la efort şi oboseală şi a reglării unor echilibre metabolice; 3) biochimia ţesuturilor şi organelor (rinichi, muşchi); 4) modificările metabolismului proteic în carenţa proteică.

A acordat o atenţie specială problemelor legate de acţiunea oxidoreducătoare a vitaminelor şi dinamica proceselor de fosforilare, care au constituit de altfel şi obiectul lucrării sale de dizertaţie. Cercetarea sensului clinic al fosforilărilor oxidative a fost urmărită în hepatită, cataractă, schizofrenie, în legătură cu insuficienţa pancreatică şi hepatică. Lucrarea sa de dizertaţie a fost apreciată ca fiind valoroasă, deschizînd interesante perspective cercetărilor viitoare. Problema participării vitaminei K în lanţul proceselor de oxidoreducere celulară, precum şi sistemul citocrom-citocromoxidază au constituit unele din ultimele sale preocupări ştiinţifice. A început de asemenea cercetări în domeniul fosforilării oxidative în cancer. Pentru cercetarea factorului morfologic al fosforilării oxidative a urmărit procesul de fosforilare la nivelul hematiei, în prezenţa vitaminelor, căutînd să stabilească modul în care aceste vitamine influenţează valorile ATP-ului. A constatat astfel că vitaminele B_1, B_6 şi mai ales acidul nicotinic menţin mai mult timp ATP-ul în cantitate mai mare în hematii, decît atunci cînd ele lipsesc.

A efectuat, în fine, cercetări în colaborare cu Clinica de boli contagioase, privind studiul electroforetic şi imunoelectroforetic al glico- şi lipoproteinelor în hepatite şi pancreatite. Din aceste cercetări s-au desprins unele concluzii importante care erau în curs de redactare.

Colaboratorii lui, avînd imaginea vie a ceea ce a fost A. Batcu, au datoria de a continua opera începută, în care el a depus toată forţa sa de muncă şi toată inteligenţa, şi pentru care a făcut reale sacrificii.

F. Şerban

PRINCIPALELE LUCRĂRI PUBLICATE DE A. BATCU

1. — *Contribuţiuni la studiul acţiunii penicilinei asupra sîngelui.* Teză de doctorat, 1948.
2. — *Acţiunea penicilinei asupra hemoleucogramei şi asupra constantelor fizico-chimice ale sîngelui* (în colab. cu D. Dorogan). Revista medico-chirurgicală, Iaşi, **59**, *5*, 329, 1948.
3. — *Contribuţiuni la studiul vagotomiei* (în colab. cu I. Iancu, C. Frasin şi A. Grigoriu). Studii şi cercetări, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, *1*, 828, 1950.
4. — *Contribuţiuni la studiul acţiunii oxido-reducătoare a acidului nicotinic. Nota I.* (în colab. cu M. Sibi, I. Gheorghiu şi C. Faigheliş). Lucrările sesiunii generale ştiinţifice a Acad. R.P.R., 1950, p. 1954.
5. — *Contribuţiuni la studiul acţiunii oxido-reducătoare a vitaminelor. Nota II. Influenţa luminii asupra reacţiilor de oxido-reducere a lactoflavinei* (în colab. cu M. Sibi şi I. Gheorghiu). Studii şi cercetări, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, *4*, 291, 1953.
6. — *Contribuţiuni la studiul acţiunii oxido-reducătoare a vitaminelor. Nota III. Formarea tiocromului sub acţiunea luminii* (în colab. cu M. Sibi şi I. Gheorghiu). Studii şi cercetări, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, *4*, 291, 1953.
7. — *Contribuţiuni la studiul acţiunii oxido-reducătoare a vitaminelor. Nota IV. Acţiunea luminii asupra modului de comparare a vitaminei B_2 cînd este în prezenţa adrenalinei* (în colab. cu M. Sibi şi I. Gheorghiu). Studii şi cercetări, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, *4*, 291, 1953.
8. — *Dozarea pregnandiolului în urină* (în colab. cu S. M. Horenstain şi F. Şerban). Obstetrica şi ginecologia, *3*, 46, 1953.

9. — *Relația dintre excitabilitatea mușchilor antagoniști și biochimismul lor. Nota I. Conținutul în apă, catalază și dehidraze la mușchii antagoniști* (în colab. cu D. Dorogan și F. Serban). Studii și cercetări, Acad. R.P.R., Filiala Iași, *5*, 297, 1954.
10. — *Modificări biochimice în hepatita epidemică* (în colab. cu A. Viță, S. Dimitriu, C. Faigheliș și F. Serban). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 4—6 iunie 1954, p. 499.
11. — *Valoarea funcțională a pancreasului exocrin în cursul evoluției hepatitei epidemice la copii* (în colab. cu R. Bărbuță, E. Palade și V. Mihul). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 4—6 iunie 1954, p. 503.
12. — *Probe morfologice ale perturbării nefronului în metabolismul lipidelor* (în colab. cu S. Brătianu, M. Stăncianu, M. Leibovici, A. Brătianu, R. Bulandra și M. Cimpoeșu). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 4—6 iunie 1954, p. 553.
13. — *Comportarea sistemului enzimatic al nefronului în faza lipopexică experimentală* (în colab. cu S. Brătianu, T. Onofrei, M. Leibovici și T. Beneș). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 4-6 iunie 1954, p. 359.
14. — *Contribuțiuni la studiul reglării echilibrului glicemic* (în colab. cu J. Nițulescu, I. Foni, Gh. Ghera și E. Enescu). Cercetări de fiziopatologie, Edit. medicală, 1955, p. 399.
15. — *Cercetări cu privire la influența scoarței cerebrale asupra echilibrului glicemic. Cercetări experimentale la iepuri și câini* (în colab. cu J. Nițulescu, I. Foni și chimiștii M. Sibi, C. Faigheliș și F. Serban). Studii și cercet. științ. Acad. R.P.R., Fil. Cluj, **VI**, *3-4*, 201, 1955.
16. — *Modificări biochimice în poliartrita cronică evolutivă și spondilita anchilopoetică* (în colab. cu I. Opreanu, O. Stroescu, P. Stănescu și V. Bejan). Medicina internă, *1*, 53, 1957.
17. — *Toxicoza și dismicrobismul intestinal ca factor favorizant în afecțiunile reumatismale* (în colab. cu I. Opreanu, V. Bejan, B. Fischer, și C. Faigheliș). Balneologia, *2*, 116, 1957.
18. — *Asupra unor aspecte metabolice în diabetul insipid* (în colab. cu M. Sibi, M. Briesse și O. Rusu). Revista medico-chirurgicală, Iași, **61**, *2*, 387, 1957.
19. — *Contribuții la studiul proteinemiei prin metoda electroforezei și precipitării fracționate cu sulfit* (în colab. cu C. Faigheliș și L. Suchar). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 25-26 februarie, 1956, *3*, p. 1433.
20. — *Contribuțiuni la studiul comparativ al proteinei cu testele de disproteinemie* (în colab. cu M. Sibi, M. Dragan, C. Faigheliș, F. Serban, M. Trandafirescu și L. Suchar). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 23-26 febr. 1956, *3*, 1433.
21. — *Modificări biochimice în astmul bronșic* (în colab. cu Gh. Crețeanu și chimiștii M. Drăgan, M. Horenstein și F. Șerban). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 23-26 februarie 1956, *1*, 154.
22. — *Tratamentul normal în osteoporozele postmenopauză* (în colab. cu M. Briesse, Gh. Ghișleag, V. Pancea și L. Jacotă). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 23-26 februarie 1956. *1*, 463,
23. — *Acțiunea penicilinei asupra hemogramei la iepure* (în colab. cu E. Ioan, și A. Bombea). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 23-26 februarie 1956, *3*, 1375.
24. — *Contribuții la studiul modificărilor biochimice ale sîngelui și urinei în timpul efortului și oboselii* (în colab. cu F. Serban, C. Faigheliș). Bul. ses. științ. a Inst. de medicină, Iași, 23-26 februarie 1956, *3*, 1441.
25. — *Constantele fizico-chimice ale sîngelui în glaucomul cronic* (în colab. cu P. Vancea și Cristina Mărculescu). Oftalmologia, *1*, 9, 1957.
26. — *Contribuții la studiul acțiunii oxido-reducătoare a vitaminelor. Nota V. Unele reacții de oxido-reducere ale piridoxinei sub influența luminii* (în colab. cu M. Sibi și C. Trandafir). Studii și cercetări de biochimie, Acad. R.P.R., *1*, 223, 1958.
27. — *Contribuțiuni la studiul acțiunii oxido-reducătoare a vitaminelor. Nota VI. Formazanul ca inducător al reacțiilor de oxido-reducere a vitaminelor* (în colab. cu M. Sibi și C. Trandafir). Studii și cercetări de biochimie, Acad. R.P.R., *1*, 223, 1958.
28. — *Contribuții la studiul modificărilor morfologice și fizico-chimice ale sîngelui sub acțiunea decorticării mono și bilaterale* (în colab. cu V. Rășcanu, C. Rotaru și A. Brătianu). Studii și cercetări de medicină Acad. R.P.R., Filiala Iași, **10**, *1*, 31, 1959.
29. — *Metodă pentru cercetarea cistinei în urină* (în colab. cu M. Sibi, M. Drăgan, C. Faigheliș, F. Serban, C. Popescu și A. Busuioc). Studii și cercetări de medicină, Acad. R.P.R., Filiala Iași, *10*, 93, 1959.

30. — *Modificări biochimice în hepatita epidemică. Nota II* (în colab. cu M. Sibi, A. Vîţă, C. Faigheliş, F. Şerban, M. Trandafirescu, S. Dimitriu, C. Popescu, şi A. Busuioc). Studii şi cercetări de medicină, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, **10**, *1*, 99, 1959.
31. — *Ciclul oestral la şobolani femeli în carenţa proteică* (în colab. cu S. Petrescu, N. Zaharia, F. Şerban, A. Cîrdei şi I. Feraru). Revista medico-chirurgicală, Iaşi, **64**, *1*, 125, 1960.
32. — *Modificări biochimice în hepatita epidemică. Nota III. Unele aspecte ale metabolismului fosforat în hepatită* (în colab. cu Maria Franche, M. Sibi, A. Vîţă, C. Faigheliş, F. Şerban, V. Mihu, A. Ovănescu, A Busuioc, S. Dimitriu). Studii şi cercetări de medicină, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, **11**, *1*, 111, 1960.
33. — *Cercetarea funcţiei fosforilante a ficatului prin proba cu miere de albine în hepatită.* Studii şi cercetări de medicină, Acad. R.P.R., Filiala Iaşi, **11**, *2*, 555, 1960.
34. — *Corelaţia dintre excitabilitatea cronaxică şi conţinutul muşchilor antagonişti în transaminaza glutamico-oxalacetică* (în colab. cu D. Dorogan, C. Faigheliş). Rev. de fiziologie normală şi patologică, *1*, 35, 1961.
35. — *Contribuţii la studiul acţiunii oxido-reducătoare a vitaminelor. Nota VII. Acţiunea oxido-reducătoare a vitaminelor K şi E.* Studii şi cercetări de biochimie, Acad. R.P.R., *4*, *1*, 135, 1961.
36. — *Contribuţii la studiul formelor de fosfor din sînge* (în colab. cu A. Busuioc). Revista medico-chirurgicală, Iaşi, **64**, *3*, 703, 1960.
37. — *Influenţa vitaminelor asupra compuşilor fosforaţi din hematii* (în colab. cu A. Busuioc). Studii şi cercetări de biochimie, Acad. R.P.R., *4*, *2*, 223, 1961.
38. — *Contribuţii la studiul cercetării proceselor de fosforilare în cataractă* (în colab. cu P. Vancea, V. Batcu, şi D. Cernătescu). Klinische Monatsblätter, *14*, 36, 1961.
39. — *Contribuţii la studiul modificărilor biochimice în hepatită. Privire de ansamblu.* Revista medico-chirurgicală, Iaşi, **65**, *1*, 159, 1961.
40. — *Unele aspecte ale biochimiei cristalinului* (în colab. cu V. Batcu). Oftalmologia, *3*, 221, 1960.

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul VI 1963

INDEX ALFABETIC

	Nr.	Pag.
BODEA C., OŞIANU D. şi CĂBULEA I., Cercetări asupra unor caractere biochimice speciale ale porumbului. III. Manifestarea heterozisului acizilor nucleici la hibrizii simpli între linii consangvinizate de porumb	4	491
BRATU V., TEITEL P. şi TURCU GH., Determinarea radiocromatografică pe schimbători de ioni a siderofilinei şi importanţa ei pentru diagnostic	2	263
BULLA AL., PĂUNESCU EUG. şi HADÎRCĂ ECATERINA, Dinamica modificărilor compoziţiei mediului de cultură în cursul dezvoltării *Mycobacterium tuberculosis*. I. Variaţii ale pH-ului, componentelor azotate, componentelor fosforate şi substanţelor reducătoare	4	501
BURUIANĂ L. M. şi PAVLU V., Activitatea polarografică a proteinelor serice şi filtratelor sulfosalicilice, la diferite specii de animale	2	207
CÎRSTEANU MIOARA, Influenţa hiperemiei experimentale, timpului şi temperaturii asupra exosmozei electroliţilor din pielea umană normală	2	255
CRISTEA ELENA, GURBAN C. şi MITU ILEANA, Factori de control ai vitezei oxidării succinatului în mitocondrii din ficat de şobolan	4	511
CURRI S. B., Histochimia mucopolizaharidelor	3	325
DANKANITS E., HARING P., Contribuţii privind acţiunea giberelinei şi a streptomicinei asupra puieţilor de pin negru (*Pinus nigra* Arn.)	3	395
DUMITRU I. F., Viteza de refacere a acizilor graşi din diferite fracţiuni fosfolipidice din creier	3	421
ELIAS M., Extragerea unui preparat de ADN din cantităţi reduse de embrioni de grîu	4	579
EŞANU V., Energia de activare a reacţiei de descompunere a H_2O_2 de către catalază la soiurile de cartofi sensibile şi la cele rezistente la atacul ciupercii *Phytophtora infestans*	1	91
FURNICĂ G., DIMITRIU A., Studiul acţiunii radiaţiilor asupra polielectroliţilor macromoleculari	3	411
FURNICĂ M., DINESCU G., NICOLESCU P., SAPATINO V., Contribuţii la studiul peroxidării în tumori	3	403
GHEŢIE VICTOR şi BUZILĂ LUCIA, Analiza electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor citoplasmatice în procesul dezvoltării frunzei de bob (*Vicia faba*)	1	49
GHEŢIE VICTOR şi BUZILĂ LUCIA, Obţinerea sucului plasmatic din seminţe	2	235
GONŢEA IANCU şi ŞUŢESCU P., Cercetări asupra pierderii de azot prin transpiraţie	2	215

	Nr.	Pag.
HARALAMBIE G., Eliminarea indicanului în efortul fizic. I. Alegerea unui procedeu de dozare adecvat	2	271
KEREKES MEDARD, Studiul acțiunii protectoare a unor glucide asupra denaturării prin căldură a proteinelor serice	2	245
KEREKES MEDARD, Studiul electroforetic al proteinelor serice denaturate prin căldură	2	251
KIȚULESCU I. și BĂLUȚĂ V., Date experimentale privind reglarea activității proteazelor prin factori fiziologici	4	523
MACOVSCHI E., Materia vie și rolul ei în hibridarea plantelor	4	467
MACOVSCHI E. și BOTOȘĂNEANU LILICA, Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante	4	485
MACOVSCHI E., FRUNZETI V. și RĂDULESCU S., Migrarea pironinei și albastrului de metilen prin tulpini de balsamine și tomate. Teoria adsorbtivă a migrării substanțelor în plante	1	23
MACOVSCHI E. și IORDACHE CORINA, Coeficienții izometrici și relațiile dintre efort și fosfagenul muscular	2	181
MOLNAR I. A., WINTER JEANETTE, WINTER D., SIMIONOVICI M. TANKO P., Prepararea unui factor lipotrop pancreatic și determinarea activității biologice	3	375
MOȚET-GRIGORAȘ D. și DRAGOMIRESCU C., Elaborarea de anticorpi în starea de inhibiție și excitație medicamentoasă	1	87
NEEDHAM D. M., Mecanismul contracției mușchiului uterin	4	459
NIȚULESCU I. și ENESCU L., Determinarea fosfatazei alcaline prin metoda electrometrică	1	109
OERIU S. și MÎRZA E., Contribuții la studiul corelației biochimice dintre vîrstă și ateroscleroză	2	201
ONEȘANU D., O metodă cromatografică pentru dozarea epicortizolului	2	281
PALLADIN A. V., Metabolismul proteic în sistemul nervos	1	7
PALLADIN A. V., Metabolismul proteic în creier în condițiile hibernării	2	173
POPESCU-ȘTEFĂNESCU A., BĂLAN C. și MEZINCESCU M. D., Cercetări comparative asupra unor metode pentru determinarea activității xantinoxidazice a ficatului	4	529
POPPA C., ENACHE FLORICA, Metodă spectrofotometrică pentru determinarea methemoglobinei sangvine în spectrul vizibil	3	369
POPOVICI D. GH. și MICUȘAN V. V., Cercetări asupra fracțiunilor proteice din sîngele matern, din sîngele noului născut și din colostru la capre	1	39
SAFTA M., Determinarea acidului lactic în nutrețul de porumb însilozat, prin metoda cromatografiei pe hîrtie	2	285
SAUCIUC AL., Date preliminare asupra unui nou produs de metabolism la *Penicillium chrysogenum*	4	539
SCHELL H. D., Acțiunea antiacetilcolinică și anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben	1	61
SCHELL H. D., Interacțiunea unor săruri cuaternare de amoniu fluorescente cu proteinele musculare	4	545
ȘERBAN M., TĂNĂSESCU D. și VASU S., Contribuții la aplicarea micrometodei Lowry în condițiile evaluării fracțiunilor proteice eluate prin gradient de concentrație de clorură de potasiu	1	115
ȘERBAN M., Filogenia proteinelor cerebrale acvosolubile și fracționarea lor chimică	3	383
ȘERBAN M. și TĂNĂSESCU D., Cercetarea comparativă a proteinelor sarcoplasmatice din musculatura striată și netedă	4	559
TURCU GR., TEITEL P. și BRATU V., Leziune biochimică eritrocitară pusă în evidență cu ajutorul fosforului radioactiv	1	97
VASU S., Enzime pectolitice din *Aspergillus niger*. I. Producerea poligalacturonazelor în medii de cultură sintetice	1	71
VILĂU C. și TETEA MARIA, Influența piridoxalului asupra activării transaminazei mitocondriale hepatice	4	573

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том VI 1963

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

	№	Стр.
К. БОДЯ, Д. ОШИАНУ и И. КЭБУЛЯ, Исследование некоторых особых биохимических признаков кукурузы. Сообщение III. Явление гетерозиса нуклеиновых кислот у простых гибридов между односортными линиями кукурузы	4	491
В. БРАТУ, П. ТАЙТЕЛ и ГР. ТУРКУ, Радиохроматографическое определение сидероферина на ионообменных веществах и его значение для диагноза	2	263
АЛ. БУЛЛА, Е. ПЭУНЕСКУ и ЕКАТЕРИНА ХАДЫРКА, Динамика изменений состава питательной среды при развитии Mycobacterium tuberculosis. Сообщение I. Вариации pH, азотистых компонентов, фосфористых компонентов и восстановительных веществ	4	501
Л. М. БУРУЯНЭ и В. ПАВЛУ, Полярографическая активность сывороточных белков и сульфосалициловых фильтратов у различных видов животных	2	207
С. ВАСУ, Пектолитические энзимы из Aspergillus niger. I. Получение полигалактуроназ и синтетических питательных средств	1	71
К. ВИЛЭУ и МАРИЯ ТОТЯ, Влияние пиридоксала на деятельность трансаминазы митохондриев печени	4	511
ВИКТОР ГЕЦИЕ и ЛУЧИЯ БУЗИЛЭ, Электрофоретический и иммуноэлектрофоретический анализ белков цитоплазмы в процессе развития листьев	1	49
ВИКТОР ГЕЦИЕ и ЛУЧИЯ БУЗИЛЭ, Получение плазматического сока из семян	2	235
ИАНКУ ГОНЦЯ и П. СУЦЕСКУ, Исследования потерь азота путем выпота	2	215
Е. ДАНКАНИТС и Р. ХАРИНГ, К вопросу о действии гибереллина и стрептомицина на саженцы Pinus nigra Arn.	3	325
И. Ф. ДУМИТРУ, Скорость обновления жирных кислот различных фосфолипидных фракций мозга	3	395
МАРГАРЕТА ЭЛИАС, Извлечение препарата дезоксирибонуклеиновой кислоты из ограниченных количеств зародыша пшеницы	4	579
В. ЕШАНУ, Энергия активации реакции разложения перекиси водорода под влиянием каталазы у сортов картофеля, чувствительных и устойчивых по отношению к действию грибка Phytophtora infestans	1	91

	№	Стр.
МЕДАРД КЕРЕКЕШ, Изучение защитного действия некоторых сахаров на денатурирование сывороточных белков под влиянием тепла	2	245
МЕДАРД КЕРЕКЕШ, Электрофоретическое исследование сывороточных белков, денатурированных под влиянием тепла	2	251
И. КИЦУЛЕСКУ и В. БЭЛУЦА, Экспериментальные данные по вопросу регулирования деятельности протеаз при помощи физиологических факторов	4	523
ЕЛЕНА КРИСТЯ, К. ГУРБАН и ИЛЯНА МИТУ, Контрольные факторы скорости окисления сукцината в митохондриях печени крысы.	4	511
С. Б. КУРРИ, Гистохимия мукополисахаридов	3	325
МИОАРА КЫРСТЯНУ, Влияние экспериментальной гиперемии, времени и температуры на эксосмоз электролитов из нормальной кожи человека	2	255
Е. МАКОВСКИЙ, Живая материя и ее роль в скрещивании растений	4	523
Е. МАКОВСКИЙ и ЛИЛИКА БОТОШЭНЯНУ, Метод расщепления при биохимических сравнительных исследованиях на растениях . . .	4	467
Е. МАКОВСКИЙ, В. ФРУНЗЕТИ и С. РЭДУЛЕСКУ, Миграция пиронина и метиленовой сини через стебли бальзаминов и томатов. Абсорбционная теория миграции веществ в растениях	1	23
Е. МАКОВСКИЙ и КОРИНА ИОРДАКЕ, Изометрические коэффициенты и соотношение между напряжением и мышечным фосфагеном	2	181
И. А. МОЛНАР, ЖАНЕТТ ВИНТЕР, Д. ВИНТЕР, М. СИМИОНОВИЧ, И. ТАНКО, Изготовление липотропного селезеночного фактора и определение биологической активности	3	375
Д. МОЦЕТ-ГРИГОРАШ и К. ДРАГОМИРЕСКУ, Выделение антител в состоянии лекарственного торможения и возбуждения	1	87
Д. М. НЭДГАМ, Механизм сокращения маточной мышцы	4	
И. НИЦУЛЕСКУ и Л. ЕНЕСКУ, Определение щелочной фосфатазы электрометрическим методом	1	109
С. ОЕРИУ и Е. МЫРЗА, К вопросу об изучении биохимического соотношения между возрастом и атеросклерозом	2	201
Д. ОНЕШАНУ, Хроматографический метод для определения эпикортизола	2	281
А. В. ПАЛЛАДИН, Обмен белков в нервной системе	1	7
А . В. ПАЛЛАДИН, Обмен белков в головном мозгу при зимней спячке	2	173
А. ПОПЕСКУ-ШТЕФЭНЕСКУ, К. БЭЛАН и М. Д. МЕЗИНЧЕСКУ, Сравнительные исследования в области методов определения деятельности ксантиноксидазы печени.	4	529
К. ПОППА и ФЛОРИКА ЕНАКЕ, Спектрофотометрический метод определения кровяного метгемоглобина в видимом спектре	3	369
Д. Г. ПОПОВИЧ и В. В. МИКУШАН, Исследование белковых фракций крови матери, крови новорожденного и молозива козы . . .	1	39
М. САФТА, Определение молочной кислоты в силосованном кукурузном корме методом хроматографии на бумаге	2	285
А. САУЧУК, Предварительные данные относительно новых продуктов метаболизма	4	539
Х. Д. ШЕЛЛ, Противоацетилхолиновое и противохолинэстеразное действие некоторых четвертичных солей аммония, производных стильбена	1	61
Х. Д. ШЕЛЛ, Взаимодействие между некоторыми четвертичными флюоресцентными солями аммония и мышечными протеинами	4	545
ГР. ТУРКУ, П. ТАЙТЕЛЬ и В. БРАТУ, Биохимическое эритроцитное поражение, выявленное при помощи радиоактивного фосфора .	1	97
М. ШЕРБАН, Д. ТЭНЭСЕСКУ и С. ВАСУ, К вопросу о микрометоде определения белков по Лаури (измененном). Применение этого метода для определения элюированных белковых фракций через градиент концентрации хлористого калия	1	115
Г. ФУРНИКЭ и А. ДИМИТРИУ, Исследования действия излучений на макромолекулярные полиэлектролиты	3	411

	№	Стр.
М. ФУРНИКЭ, Г. ДИНЕСКУ, П. НИКОЛЕСКУ, В. САПАТИНО, К вопросу об исследовании окисления в перекисные соединения в опухолях	3	403
Г. ХАРАЛАМБИЕ, Выделение индикана при физической нагрузке. I. Выбор подходящего метода определения	2	271
М. ШЕРБАН, Филогенезис растворимых в воде белков мозга и их химическое фракционирование	3	383
МИХАЙ ШЕРБАН и ДИНУ ТЭНЭСЕСКУ, Сравнительное исследование протеинов саркоплазмы поперечнополосатой и гладкой мускулатуры	4	559

F 1330

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome VI 1963

INDEX ALPHABÉTIQUE

	Nr.	Page
BODEA C., OSIANU D. et CĂBULEA I., Recherches sur certains caractères biochimiques spéciaux du maïs. III. Manifestation de l'hétérozis des acides nucléiques chez les hybrides simples issus de lignées consanguines de maïs	4	491
BRATU V., TEITEL P. et TURCU GR., Détermination radiochromatographique sur échangeurs d'ions de la sidérophiline et son importance diagnostique	2	263
BULLA AL., PĂUNESCU EUG. et HADÎRCA ECATERINA, Dynamique des modifications de la composition du milieu de culture au cours du développement du *Mycobacterium tuberculosis*. I. Variations du pH, des composants azotés et phosphorés et des substances réductrices	4	501
BURUIANĂ L. M. et PAVLU V., Activité polarographique des protéines sériques et des filtrats sulfosalicyliques chez différentes espèces animales	2	207
CÎRSTEANU MIOARA, Influence de l'hyperhémie expérimentale, du temps et de la température sur l'exosmose des électrolytes de la peau humaine normale	2	255
CRISTEA ELENA, GURBAN C. et MITU ILEANA, Facteurs de contrôle de la vitesse d'oxydation du succinate dans les mitochondries du foie des rats	4	511
CURRI S. B., Histochimie des mucopolysaccharides	3	325
DANKANITS E. et HARING P., Contribution concernant l'action de la gibérelline et de la streptomycine sur les plants de pin noir (*Pinus nigra* Arn.)	3	395
DUMITRU I. F., Vitesse de réfection des acides gras des différentes fractions phospholipidiques du cerveau	3	421
ELIAS MARGARETA, Extraction d'une préparation d'ADM à partir de quantités réduites d'embryons de blé	4	579
EŞANU V., Energie d'activation de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase chez les variétés de pommes de terre sensibles et chez celles résistantes à l'attaque du champignon *Phytophthroa infestans*	1	91
FURNICĂ GH. et DIMITRIU A., Etude de l'action des radiations sur les polyélectrolytes macromoléculaires. IV. La dégradation radiolytique des protéines	3	411
FURNICĂ M., DINESCU G., NICOLESCU P. et SAPATINO V., Contribution à l'étude de la peroxydation dans les tumeurs	3	403
GHEŢIE VICTOR et BUZILĂ LUCIA, Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique des protéines cytoplasmatique au cours du développement de la feuille de fève (*Vicia faba*)	1	49
GHEŢIE VICTOR et BUZILĂ LUCIA, Obtention du suc plasmatique des graines	2	235

	Nr.	age
GONŢEA IANCU et ŞUŢESCU P., Recherches sur la déperdition d'azote par transpiration	2	215
HARALAMBIE G., L'élimination de l'indicane pendant l'effort physique. I. Choix d'un procédé de dosage adéquat	2	271
KEREKES MEDARD, Etude électrophorétique des protéines sériques dénaturées par la chaleur	2	251
KEREKES MEDARD, Action protectrice de certains glucides sur la dénaturation par la chaleur des protéines sériques	2	245
KIŢULESCU I. et BĂLUŢĂ V., Données expérimentales concernant le réglage de l'activité des protéases par des facteurs physiologiques	4	523
MACOVSCHI E., La matière vivante et son rôle dans l'hybridation des plantes	4	467
MACOVSCHI E. et BOTOŞĂNEANU LILICA, Méthode du fendage pour les recherches biochimiques comparatives sur des plantes	4	485
MACOVSCHI E., FRUNZETI V. et RĂDULESCU S., La migration de la pyronine et du bleu de métyhlène dans les tiges de balsamines et de tomates. Théorie adsorptive de la migration des substances dans les plantes	1	23
MACOVSCHI E. et IORDACHE CORINA, Les coefficients isométriques et les relations entre l'effort et le phosphagène musculaire	2	181
MOLNAR I. A., WINTER JEANETTE, WINTER D., SIMIONOVITCH M. et TANKO P., Préparation d'un facteur lipotrope pancréatique et détermination de son activité biologique	3	375
MOŢET-GRIGORAŞ D. et DRAGOMIRESCU C., Elaboration d'anticorps en état d'inhibition et d'excitation médicamenteuse	1	87
NEEDHAM D. M., Le mécanisme de la contraction du muscle utérin	4	459
NIŢULESCU I. et ENESCU L., Détermination de la phosphatase alcaline par la méthode électrométrique	1	109
OERIU S. et MÎRZA E., Contribution à l'étude de la corélation biochimique entre l'âge et l'athérosclérose	2	201
ONEŞANU D., Méthode chromatographique pour le dosage de l'épicortisole	2	281
PALLADIN A. V., Le métabolisme protéique dans le système nerveux	1	7
PALLADIN A. V., Métabolisme protéique dans le cerveau pendant l'hibernation	2	173
POPESCU-ŞTEFĂNESCU A., BĂLAN C. et MEZINCESCU M. D., Recherches comparative sur deux méthodes pour la détermination de l'activité xanthinoxydasique du foie	4	429
POPPA C. et ENACHE FLORICA, Méthode spectrophotométrique pour la détermination de la méthémoglobine sanguine dans le spectre visible.	3	369
POPOVICI D. GH. et MICUŞAN V. V., Recherches sur les fractions protéiques du sang maternel, du sang du nouveau-né et du colostrum chez les chèvres	1	39
SAFTA M., Détermination chromatographique sur papier de l'acide lactique dans le maïs ensilé	2	285
SAUCIUC AL., Données préliminaires sur un nouveau produit métabolique du *Penicillium chrysogenum*	4	539
SCHELL H. D., Action antiacétylcholinique et anticholinestérasique de quelques sels quaternaires d'ammonium dérivés du stilbène	1	61
SCHELL H. D., Interaction de quelques sels quaternaires d'ammonium fluorescents avec les protéines musculaires	4	545
ŞERBAN M., TĂNĂSESCU D., et VASU S., Contribution à l'application de la microméthode de Lowry dans les conditions de l'évaluation des fractions protéiques éluées par gradient de concentration de chlorure de potassium	1	115
ŞERBAN M., La phylogénie des protéines cérébrales et leur fractionnement chimique	3	383
ŞERBAN M. et TĂNĂSESCU D., Etude comparée des protéines sarcoplasmatiques des musculatures striée et lisse	4	559
TURCU GR., TEITEL P. et BRATU V., Lésion érythrocytaire biochimique mise en évidence à l'aide du phosphore radioactif	1	97
VASU S., Enzymes pectolytiques de l'*Aspergillus niger*. I. Production des polygalacturonases dans des milieux synthétiques	1	71
VILĂU C. et TETEA MARIA, Influence du pyridoxal sur l'activation de la transaminase mitochondriale hépatique.	4	573

42

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.
T. NĂSCUȚIU, **Cromatografia pe hîrtie a substanțelor anorganice**, 220 p. + 3 pl., 13,90 lei.
J. REICHEL, **Tehnologia coloranților antrachinonici**, 440 p. + 3 pl., 21,50 lei.

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut:

Anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
Anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
Anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
Anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei);
Anul V, 1962, 4 n-re (a 5 lei);
Anul VI, 1963, 3 n-re (a 5 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare în Bucureşti:
la
LIBRĂRIA ACADEMIEI;
LIBRĂRIA „MIHAIL EMINESCU";
LIBRĂRIA NOASTRĂ nr. 17;
LIBRĂRIA NOASTRĂ nr. 4;
în Cluj:
la
LIBRĂRIA „A. S. PUŞKIN";
în Iaşi:
la
LIBRĂRIA CENTRALĂ;
în Timişoara:
la LIBRĂRIA NOASTRĂ nr. 1

precum şi la chioşcurile şi magazinele de difuzare a presei din mediul urban.

Se pot comanda şi prin poştă la librăria
„CARTEA PRIN POŞTĂ"
Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie.

Abonamentele se fac la oficiile poştale, prin factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate, cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin Întreprinderea de stat pentru comerţul exterior „Cartimex", str. Aristide Briand nr. 14, sau căsuţa poştală 134—135, Bucureşti.

c. 4190 I. P. „Informaţia"

43816

Lei 7.